

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

**Dinámica del quimerismo en sangre periférica, médula ósea y
linajes leucocitarios en el trasplante alogénico de progenitores
hematopoyéticos**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Almudena Navarro Bailón

Directores

**Ismael Buño Borde
Carolina Martínez-Laperche
José Luis Díez Martín**

Madrid

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Doctorado en Investigación en Ciencias Médico-Quirúrgicas

Departamento de Medicina



TESIS DOCTORAL

Dinámica del quimerismo en sangre periférica, médula ósea y linajes leucocitarios en el trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Almudena Navarro Bailón

DIRECTORES

Ismael Buño Borde

José Luis Díez Martín

Carolina Martínez Laperche

Madrid, 2019



**Hospital General Universitario
Gregorio Marañón**



© Almudena Navarro Bailón,
2019



U N I V E R S I D A D
COMPLUTENSE
M A D R I D

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR

Dña. Almudena Navarro Bailón, estudiante en el Programa de Doctorado Investigación en Ciencias Médico-Quirúrgicas, de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid, como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor y titulada: **“Dinámica del quimerismo en linajes leucocitarios en el trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos”** y dirigida por Ismael Buño Borde, Carolina Martínez Laperche y José Luis Díez Martín,

DECLARO QUE:

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita.

Del mismo modo, asumo frente a la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

En Madrid, a 11 de julio de 2019

Fdo.:

Agradecimientos

A mis directores de tesis. Porque espero haberme contagiado aunque sea un poquito de las grandísimas cualidades que tenéis cada uno de vosotros.

Al Servicio de Hematología del Hospital General Universitario Gregorio Marañón, y más especialmente al equipo de la Unidad de Trasplante.

A mi familia del Laboratorio de Genética Hematológica, por su generosidad y buen hacer que han hecho posible este trabajo.

A los pacientes y sus familias, que son el motor de nuestra ambición por mejorar la medicina.

Al Servicio de Hematología del Hospital Universitario de Salamanca, mi nueva casa, por su apoyo absoluto de este proyecto.

A mi familia, por haberme impulsado y ayudado a crecer.

A Pablo, por entenderme tan bien y animarme siempre a conseguir nuevas metas.

«La verdadera ciencia enseña, sobre todo, a dudar y a ser ignorante»

Miguel de Unamuno

Abreviaturas

AIR.....	Acondicionamiento de intensidad reducida
Alo-TPH	Trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos
AMA	Acondicionamiento mieloablativo
ATG.....	Globulina antitimocítica
Bu	Busulfán
CD3+	Células CD3+
CD34+	Células CD34+
CE	Corticoesteroides
CM.....	Células mieloides
CMV.....	Citomegalovirus
CNT.....	Células nucleadas totales
CPH.....	Células progenitoras hematopoyéticas
CsA	Ciclosporina
Cy.....	Ciclofosfamida
ddPCR.....	PCR digital (del inglés <i>Droplet Digital PCR</i>)
DE.....	Donante emparentado HLA idéntico
DNE	Donante no emparentado HLA idéntico
EICL.....	Efecto injerto contra leucemia
EICR	Enfermedad injerto contra receptor
EICRa	Enfermedad injerto contra receptor aguda
EICRc.....	Enfermedad injerto contra receptor crónica
EICT	Efecto injerto contra tumor
FISH	Hibridación <i>in situ</i> fluorescente (del inglés <i>Fluorescence in situ hybridization</i>)
Flu.....	Fludarabina
Haplo.....	Donante emparentado haploidéntico
IA	Incidencia acumulada
ICT	Irradiación corporal total
ILD	Infusión de linfocitos o leucocitos del donante
Indel	Polimorfismo de inserción/delección
LA	Linfocitos T activados

LB.....	Linfocitos B
LH	Linfoma de Hodgkin
LLA.....	Leucemia linfoblástica aguda
LLC.....	Leucemia linfática crónica
LMA	Leucemia mieloblástica aguda
LMC	Leucemia mieloide crónica
LNH.....	Linfoma no Hodgkin
LT.....	Linfocitos T
Mel	Melfalán
MM.....	Mieloma múltiple
MMF.....	Micofenolato de mofetilo
MO	Médula ósea
MRT	Mortalidad relacionada con el trasplante
Mtx	Metotrexato
NK.....	Células <i>natural killer</i>
NGS.....	Secuenciación masiva (del inglés <i>Next Generation Sequencing</i>)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés <i>Polymerase chain reaction</i>)
PCR-STR.....	PCR de microsatélites (del inglés <i>Short Tandem Repeats</i>)
PH	Progenitores hematopoyéticos
QC.....	Quimerismo completo
QM	Quimerismo mixto
qPCR.....	PCR cuantitativa (del inglés <i>Quantitative PCR</i>)
QT.....	Quimioterapia
RA.....	Reconstitución autóloga
RC	Respuesta completa
RFLP.....	Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (del inglés <i>Restriction fragment length polymorphism</i>)
SCU	Sangre de cordón umbilical
SG	Supervivencia global
SLE	Supervivencia libre de evento
SMD.....	Síndrome mielodisplásico
SMP	Síndrome mieloproliferativo

SNP Polimorfismo de un solo nucleótido
SP..... Sangre periférica
TPH Trasplante de progenitores hematopoyéticos
Treg Linfocitos T reguladores

Índice

Abreviaturas	1
Resumen	6
Abstract.....	7
Introducción.....	9
1.- Recuerdo histórico.....	9
2.- Quimerismo	15
a) Definición y técnicas de cuantificación del quimerismo	15
b) Quimerismo y linajes leucocitarios	18
c) Factores pretrasplante que influyen en la dinámica del quimerismo	19
d) Dinámica del quimerismo en linajes leucocitarios y evaluación del prendimiento....	21
e) Quimerismo y enfermedad injerto contra receptor (EICR).....	24
f) Quimerismo y recaída	26
g) Quimerismo y supervivencia	30
h) Recomendaciones actuales en quimerismo.....	31
Hipótesis	33
Objetivos.....	35
Objetivo global.....	35
Objetivos específicos	35
Pacientes y métodos.....	37
1.- Definiciones	37
2.- Pacientes.....	39
3.- Estudios de quimerismo	42
4.- Mues tras.....	43
5.- Separación inmunomagnética y purificación del ADN	43
6.- Realización de la PCR y análisis de resultados.....	44
7.- Análisis estadístico.....	45
Resultados	47
1.- Quimerismo y prendimiento	47
a) Estudio descriptivo del prendimiento	47
b) Adquisición de quimerismo completo en compartimentos celulares.....	49
2.- Factores pretrasplante y quimerismo	52
a) Quimerismo en sangre periférica	52
b) Quimerismo en linfocitos T.....	56

c) Quimerismo en células mieloides.....	61
d) Quimerismo en médula ósea.....	64
e) Quimerismo en células CD34+.....	68
3.- Quimerismo y complicaciones postrasplante	70
a) Estudio descriptivo de los resultados del trasplante.....	70
b) Quimerismo y fracaso del injerto	71
c) EICR.....	73
d) Recaída.....	90
e) Mortalidad relacionada con el trasplante	94
f) Supervivencia global	99
Discusión.....	105
1.- Dinámica del quimerismo en sangre periférica, médula ósea y linajes leucocitarios.....	106
3.- Quimerismo y complicaciones postrasplante	110
g) Fracaso del injerto	110
h) Quimerismo y EICR	110
i) Quimerismo y recaída.....	111
j) Quimerismo y supervivencia	113
Conclusiones	115
Referencias	117

El trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos (alo-TPH) se basa en la sustitución completa de una hematopoyesis enferma por la de un donante sano, y a día de hoy constituye la única opción curativa en múltiples patologías. No obstante, es un tratamiento altamente complejo que requiere un control muy estrecho de los pacientes. La cuantificación de ADN de donante y de receptor, o análisis del quimerismo, constituye una herramienta para monitorizar el éxito del procedimiento y es crucial en el diagnóstico y manejo de algunas complicaciones. El objetivo de este trabajo consistió en analizar y comparar la dinámica del quimerismo en sangre periférica (SP), médula ósea (MO) y linajes leucocitarios y estudiar su relación con factores pretrasplante y con el desarrollo de complicaciones. Se analizó el quimerismo en 199 pacientes que recibieron alo-TPH en el Hospital General Universitario Gregorio Marañón entre los años 2010 y 2015. El análisis se realizó mediante PCR de microsatélites en SP y MO totales y en diferentes linajes leucocitarios separados mediante tecnología inmunomagnética. Se encontraron diferencias en la adquisición de quimerismo completo (QC) entre los distintos compartimentos celulares, siendo más temprana en células mieloides (CM), células *natural killer* y linfocitos B que en SP y en linfocitos T (LT). El estudio del quimerismo en SP y LT resultó altamente informativo en el diagnóstico de fracaso del injerto. Sin embargo, el análisis del quimerismo en CM resultó ser superponible al de SP total y no se correlacionó con el desarrollo de complicaciones. En el estudio de los factores pretrasplante, se encontró relación entre la dinámica del quimerismo y la edad del paciente al alo-TPH, la enfermedad de base, la intensidad de tratamiento quimioterápico previo, el tipo de donante y la situación de la enfermedad al alo-TPH. Los pacientes que recibieron un alo-TPH haploidéntico adquirieron QC de forma más temprana en todos los linajes leucocitarios. En cuanto a las complicaciones postrasplante, no se encontró relación entre el estatus del quimerismo y el desarrollo de enfermedad injerto contra receptor aguda o crónica, si bien se necesitaría ampliar el tamaño muestral del trabajo para poder tener en cuenta las modificaciones de la inmunosupresión y estudiar mejor esta asociación. Sí se encontró mayor incidencia de recaída en aquellos receptores de alo-TPH de donante emparentado con quimerismo mixto (QM) en MO a día +30, así como en los pacientes con diagnóstico de leucemia aguda mieloblástica y QM a día +30 en células CD34+ purificadas de MO. Por último, la adquisición precoz de QC en SP, LT y MO se correlacionó con una mejor supervivencia global. En conclusión, el quimerismo presenta una dinámica muy diferente en función del compartimento celular estudiado y de distintos factores dependientes del paciente y del procedimiento, y su estudio puede ayudar a comprender mejor los mecanismos biológicos que subyacen al éxito o fracaso del alo-TPH. Por lo tanto, el quimerismo constituye una prueba diagnóstica necesaria en la práctica clínica habitual para la monitorización del prendimiento y el diagnóstico de fracaso del injerto, y es altamente informativa como prueba complementaria en el diagnóstico y manejo de otras complicaciones.

Abstract

Allogeneic hematopoietic stem cell transplant (allo-HSCT) consists in the complete replacement of a damaged haematopoiesis by another from a healthy donor. It is nowadays the only curative option for different diseases. However, it is a highly complex treatment, which requires strict monitoring of patients. Chimerism analysis (donor and recipient DNA quantification), is a useful tool in assessing adequate evolution of the procedure and it is crucial in diagnosing and managing several complications. Our objective was to analyse and compare chimerism dynamics in peripheral blood (PB), bone marrow (BM) and leukocyte lineages as well as to study the relationship between chimerism and several pre-transplant factors and the development of complications. We included 199 allo-HSCT recipients transplanted at Hospital General Universitario Gregorio Marañón between 2010 and 2015. Chimerism analysis was performed using microsatellite PCR in PB, BM and different leukocyte subsets, obtained by immunomagnetic separation. Significant differences in chimerism dynamics among leukocyte lineages were found, with an early achievement of complete donor chimerism (CC) in myeloid cells (MyC), NK cells and B cells, and a later achievement of CC in PB and T cells (TC). Chimerism results were highly informative regarding graft failure diagnosis. Nevertheless, MyC chimerism results were similar to unseparated PB, and no correlation was found between MyC chimerism and the development of complications. Chimerism dynamics was found to be influenced by recipient age at allo-HSCT, disease diagnosis, intensity of prior chemotherapy, the type of donor and pre-transplant disease status. Early CC was observed in all leukocyte subsets in haploidentical allo-HSCT recipients. Regarding post-transplant complications, no relationship was found between chimerism status and development of acute or chronic graft *versus* host disease; a larger study analysing chimerism and changes in immunosuppression would be needed in order to further investigate this association. Higher relapse incidence was found in matched related donor allo-HSCT recipients with persistent BM mixed chimerism (MC) at day 30, as well as in patients with diagnosis of acute myeloblastic leukemia and MC at day 30 in BM-isolated CD34+ cells. Early CC achievement in PB, TC and BM was correlated with better overall survival. In conclusion, different chimerism dynamics is observed in each leukocyte subset, and depending on different patient and procedure characteristics. Studying this dynamics can help us better understand the biologic mechanisms underlying success or failure of each allo-HSCT. Therefore, chimerism analysis is a mandatory diagnostic tool in clinical practice to monitor engraftment or to establish graft failure diagnosis, and it provides important complementary information in clinical diagnosis and management of other transplant-derived complications.

Introducción

1.- Recuerdo histórico

El trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos (alo-TPH) es un tratamiento ampliamente utilizado en el manejo de enfermedades hematológicas, tanto neoplásicas como no neoplásicas, y constituye la única opción curativa para muchas de ellas (1). El procedimiento se basa en la premisa de que una sola célula pluripotente es capaz de regenerar un sistema hematopoyético completo. Esto permitiría aumentar la intensidad de los tratamientos citotóxicos por encima del umbral de toxicidad medular. De este modo, se podría sustituir una hematopoyesis enferma (parcial, defectuosa, o afecta por una neoplasia) por una hematopoyesis nueva totalmente sana. Durante las últimas décadas, el alo-TPH ha pasado de ser un procedimiento experimental a constituir el tratamiento de elección de muchas neoplasias hematológicas.

Los primeros estudios en el ámbito del trasplante tuvieron lugar a principios de siglo XX. Se realizaron distintos trasplantes experimentales en animales, descubriéndose que en el momento que se implantaba un órgano de otro individuo, de alguna manera las células del receptor lo reconocían como extraño y se producía un rechazo (2). Por otra parte, en la Segunda Guerra Mundial, se iniciaron experimentos sobre los efectos biológicos de la irradiación en los seres vivos. En varios de estos experimentos se observó que los animales sobrevivían a exposiciones letales a radiación si se les protegía el bazo o el fémur con una lámina de plomo, o si se les infundían posteriormente células del bazo o de la médula ósea (MO) (3,4). En esa época había mucha controversia sobre si el efecto protector de la médula se debía a una “sustancia de naturaleza no celular” (hipótesis humoral) o a las células trasplantadas (hipótesis celular). Más adelante se realizaron experimentos en modelos animales, y se descubrió que la base de la recuperación de estos individuos radicaba en las células que se les infundían, desbancando las hipótesis humorales (2).

El primer reporte de un tratamiento de radioterapia y quimioterapia (QT) seguidos de la infusión intravenosa de MO en humanos fue publicado por Donnall Thomas en la revista New England Journal of Medicine en el año 1957 (5). La mayoría de los pacientes falleció por fallo del injerto o por recaída, pero uno de los pacientes presentó un prendimiento transitorio. Éste, supondría el inicio de una larga investigación clínica y de laboratorio hasta que el procedimiento comenzó a funcionar.

A lo largo de los años 50 y 60 hubo múltiples intentos fallidos de alo-TPH a víctimas nucleares y pacientes con distintas neoplasias hematológicas. Dado que se desconocía el sistema de histocompatibilidad HLA, los investigadores no intentaban buscar donantes compatibles con los receptores, por lo que estos procedimientos estaban abocados al fracaso. En 1970 se publicó una revisión de cerca de 200 casos de alo-TPH en humanos, ninguno con éxito (6). Fue entonces cuando los investigadores comenzaron a plantearse que probablemente faltara conocimiento para realizar en humanos lo que se había conseguido realizar en los modelos murinos (que no requieren tipaje de histocompatibilidad), y se retomaron los modelos animales.

En ese momento, Donnall Thomas comenzó a realizar trasplantes en modelos caninos, y observó que estos presentaban las mismas complicaciones derivadas del procedimiento que los humanos (rechazo del injerto, enfermedad injerto contra receptor [EICR], y muerte de infecciones oportunistas). Sin embargo, de vez en cuando alguno de los perros mostraba una larga supervivencia manteniendo la hematopoyesis del donante. En ese momento, Thomas se planteó que la clave del éxito del alo-TPH podía radicar en la selección de un donante adecuado (7).

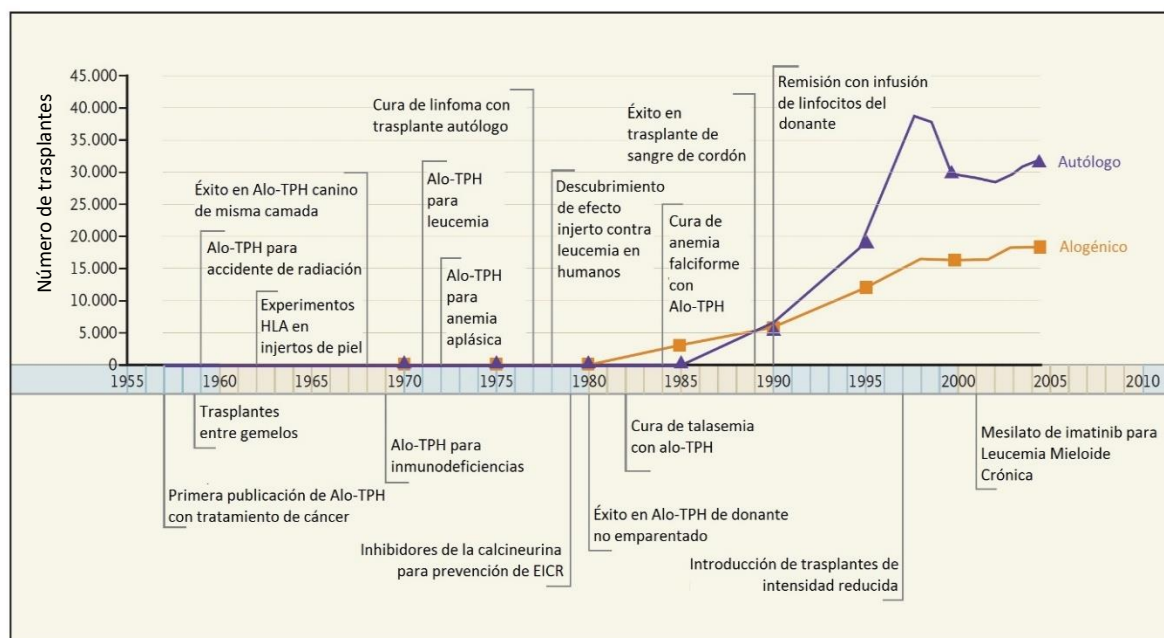


Figura 1.- Número de alo-TPH y avances en el campo, 1957-2006. Adaptado de Appelbaum FR, et al. (7)

Thomas y su equipo de Seattle llegaron a desarrollar, en los años 60, métodos rudimentarios de tipaje de histocompatibilidad canina, consiguiendo que sobreviviera la mayoría de perros empleando un esquema que consistía en irradiación con posterior infusión de injertos de perros de la misma camada, acompañadas de un curso corto de inmunosupresión (2).

A principios de los 70, Thomas comenzó los primeros ensayos clínicos en humanos, empleando como donantes hermanos compatibles (8,9). Los primeros pacientes tenían leucemias muy avanzadas, y Thomas llegaba a pedirle a miembros de su plantilla que donaran plaquetas, empleaba pacientes de leucemia mieloide crónica (LMC) como donantes de granulocitos y trabajó con Robert Hickman en el desarrollo de un catéter para la nutrición endovenosa (7). Cuando los pacientes desarrollaban EICR, Thomas infundía linfocitos humanos a caballos para obtener globulina antitimocítica. La mayoría de los pacientes fallecía de progresión de la leucemia o de complicaciones del procedimiento, pero algunos entraban en remisión completa (7). En 1977 el equipo de Seattle reportó una serie de 100 pacientes de leucemia trasplantados, con 13 supervivientes a largo plazo después del procedimiento (10,11).



Figura 2.- Donnall Thomas. Fuente Nobelprize.org (11)

A partir de entonces, el trasplante comenzó a realizarse en pacientes con enfermedades neoplásicas menos avanzadas, con gran mejoría de los resultados, y posteriormente a pacientes con otras patologías como LMC o hemoglobinopatías (2).

En 1990, Thomas compartió el Premio Nobel de Medicina con Joseph Murray (primer trasplante renal) por sus descubrimientos en el trasplante de órganos y células en el tratamiento de enfermedades humanas (11).

En los años posteriores, el procedimiento del trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH) se iría refinando cada vez más, hasta constituir un tratamiento altamente especializado. Los principales acontecimientos que han contribuido a la mejora de la técnica son (12):

1. El descubrimiento de nuevos fármacos para la profilaxis y el tratamiento de la EICR, y el descubrimiento de otros métodos de prevención de EICR, como la eliminación de células T.
2. La mejora en la prevención y tratamiento de soporte de complicaciones precoces (aire filtrado, hidratación, antibioterapia, fraccionamiento de la irradiación corporal total [ICT]...).
3. La mejoría en los tratamientos de enfermedades infecciosas con la aparición de nuevos antivirales como el ganciclovir y antifúngicos como la anfotericina B y los azoles.
4. El diseño de acondicionamientos ajustados a cada patología, con la aparición en los últimos años de regímenes de acondicionamiento de intensidad reducida (AIR).
5. La ampliación del abanico de donantes disponibles con la introducción de los registros de donantes voluntarios y el desarrollo de TPH de donantes con diferencias en la identidad HLA y de sangre de cordón umbilical (SCU), y más recientemente del TPH de donante haploidéntico.
6. La mejora de las técnicas de tipaje HLA.
7. El empleo de nuevas fuentes de células progenitoras hematopoyéticas (CPH, la sangre periférica [SP] y la SCU).
8. El descubrimiento del papel del efecto injerto contra tumor (EICT), y el desarrollo de estrategias de inmunomodulación (cambios en la inmunosupresión, infusiones de linfocitos del donante).
9. La introducción de nuevos fármacos que permiten un mejor control de la enfermedad pretrasplante, así como el desarrollo de estrategias de prevención y tratamiento de la recaída postrasplante.

A día de hoy, el Alo-TPH se realiza de forma rutinaria y constituye el tratamiento estándar de muchas patologías hematológicas, y para la mayoría de ellas, la única opción curativa. En el último informe (2017) se reportaron en el registro de TPH del grupo europeo de trasplante hematopoyético (EBMT) 18.281 alo-TPHs de más de 550 centros diferentes con sede en más de 60 países, alcanzando el récord de número de TPHs hasta la fecha. La tendencia en los últimos años en el número de TPHs realizados es ascendente (13). En España se realizaron 1.231 Alo-TPHs a lo largo del año 2017, manteniéndose la tendencia ascendente en número, de forma similar al grupo europeo (14).



Figura 3.- TPHs en España entre los años 1994-2017. Memoria de actividad ONT 2017 (14)

El perfeccionamiento de la técnica de TPH a lo largo de los últimos años, ha conseguido que este tratamiento se pueda ofrecer de forma estándar a todos los pacientes que lo necesiten y que no presenten contraindicación para su realización. A pesar de los avances mencionados, sigue siendo un procedimiento con un alto número de complicaciones. La supervivencia global (SG) a 5 años se encuentra en torno a un 60 % (15), siendo la recaída la causa más frecuente de mortalidad (40 %).

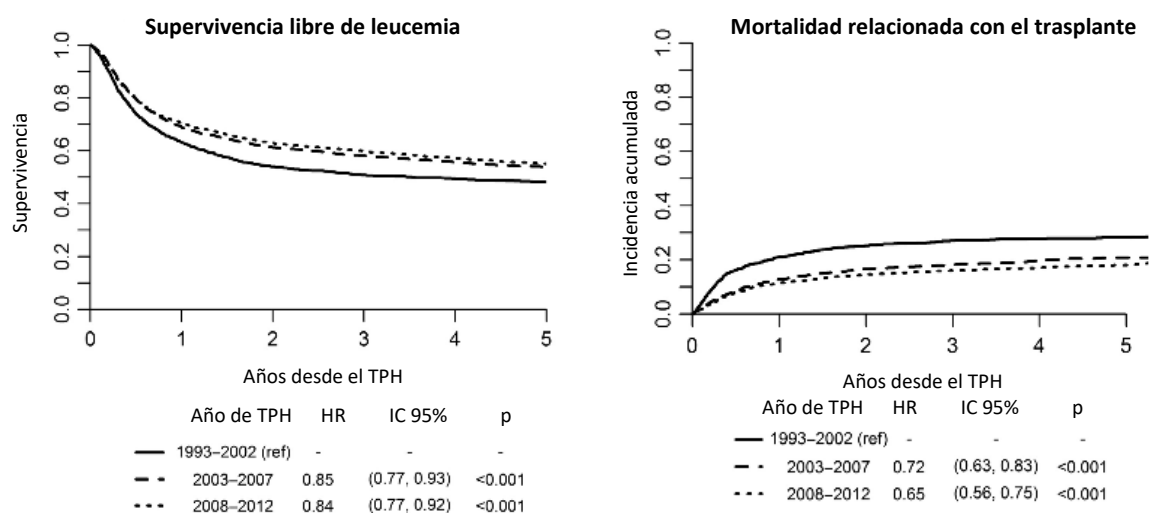


Figura 4.- Resultados del alo-TPH en LMA a lo largo de dos décadas (estudio de registro del EBMT). Traducido de Canaani J, *et al.* (15)

El alo-TPH consiste en la administración de un régimen de acondicionamiento basado habitualmente en QT (pero a veces incorporando también radioterapia), con el objeto de 1) eliminar las posibles células malignas circulantes y 2) preparar el nicho medular del receptor para el injerto de las células del donante. Tras el acondicionamiento, se infundirían las CPH del donante y el paciente pasaría por una fase de aplasia, durante la cual es especialmente importante la correcta profilaxis y tratamiento de las infecciones y el manejo de los efectos secundarios del acondicionamiento administrado. A partir de las 2-4 semanas de la infusión de las CPH, se produciría el prendimiento de las mismas, con el posible desarrollo de EICR aguda o crónica en función del momento de aparición y de las características clínicas de ésta. Sin embargo, a pesar de haberse producido un adecuado prendimiento, los pacientes pueden desarrollar múltiples complicaciones, bien directamente relacionadas con el procedimiento o con la toxicidad de los fármacos empleados, bien derivadas de su enfermedad de base, o bien producidas por diferentes patógenos según el tipo de TPH y los tratamientos recibidos.

Por tanto, se trata de un procedimiento de alta complejidad que requiere un seguimiento y manejo clínico muy estrechos para garantizar su éxito. La base del éxito del alo-TPH se encuentra en la alorreactividad de las células del donante para reconocer las células tumorales (EICT). No obstante, una de las complicaciones más frecuentes del procedimiento es el desarrollo de EICR, o la reacción resultante del reconocimiento por parte de los linfocitos T (LT) del donante de antígenos del receptor como extraños (16). La situación ideal de todo TPH supone un equilibrio entre fuerzas inmunes procedentes del donante y del receptor (Figura 5). Esta situación ideal supone conseguir un adecuado EICT, sin que el paciente desarrolle EICR.

La alorreactividad del procedimiento se ve afectada por distintos factores (Figura 5). Por un lado, estarían los factores dependientes de inóculo, ya que es conocido que el empleo de SP y de inóculos con más celularidad y más contenido de LT fomentarían la alorreactividad de las células del donante. Por otra parte, la intensidad del acondicionamiento también favorecería el efecto EICR/EICT. Por último, estarían los factores dependientes de la barrera HLA, ya que una profilaxis de EICR más intensa disminuiría la alorreactividad del donante, y la disparidad HLA influiría en la alorreactividad tanto de donante como de receptor.

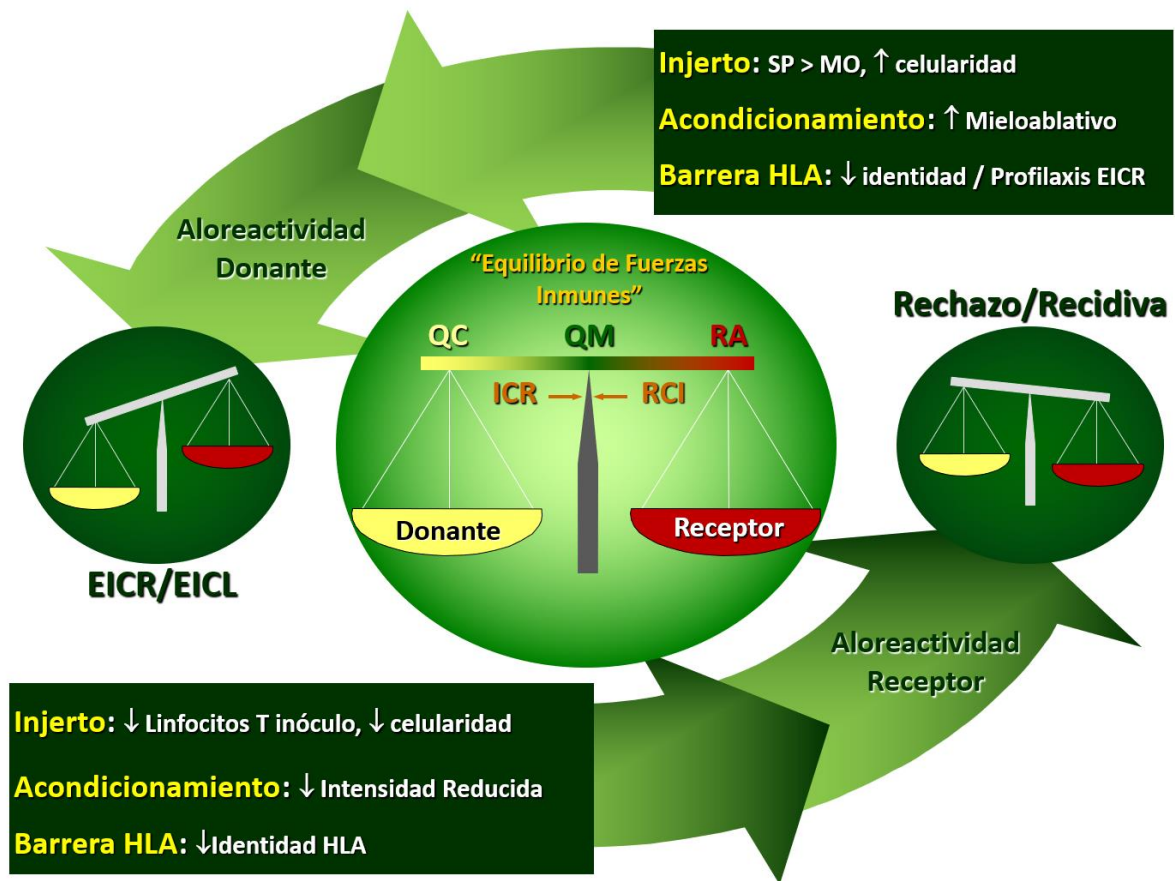


Figura 5.- Alorreactividad de donante y receptor en el alo-TPH. Figura cortesía de los Dres. José Luis Díez Martín e Ismael Buño Borde. RA: reconstitución autóloga; ICR: injerto contra receptor; RCI: receptor contra injerto; EICL: efecto injerto contra leucemia. El “equilibrio de fuerzas inmunes” puede verse alterado por múltiples factores que favorecen la alorreactividad del donante o del receptor. El empleo de la SP como fuente de PH favorece la alorreactividad del donante, así como los inóculos con mayor celularidad o mayor contenido de LT. Los acondicionamientos de mayor intensidad (mieloablativos) también disminuirían la actividad inmune del receptor y favorecerían la del donante. Una profilaxis de EICR más intensiva disminuiría la actividad de las células del donante. Las diferencias en el sistema HLA aumentan la alorreactividad tanto de donante como de receptor.

Una de las piedras angulares para monitorizar la evolución de la alorreactividad en el alo-TPH es la cuantificación del quimerismo, o de la proporción de células del donante y del receptor presentes en cada momento del TPH. De esta forma, tras la administración de la QT de acondicionamiento, el quimerismo permite monitorizar el prendimiento de las células hematopoyéticas del donante, para tomar decisiones precoces en caso de sospecha de fracaso del injerto. Por otro lado, algunos estudios sugieren que el desarrollo de EICR se relaciona con la rápida adquisición de QC de células del donante, como se desarrollará más adelante. En último lugar, la reaparición progresiva de células del receptor tras la consecución de quimerismo completo (QC) nos debe hacer sospechar la recaída de la enfermedad de base. Por todos estos motivos, la monitorización del quimerismo es una práctica habitual altamente informativa en los pacientes trasplantados.

2.- Quimerismo

a) Definición y técnicas de cuantificación del quimerismo

En la mitología griega, una quimera era un engendro híbrido con cuerpo de cabra, cola de serpiente o dragón y cabeza de león, que escupía fuego y aterrorizaba a los habitantes de Asia Menor.



Figura 6.- Quimera de Arezzo (c. 400 a. C. Florencia, Italia). Fuente wikiwand.com (14)

“Quimera” es un término científico acuñado en medicina por Anderson y colaboradores en 1951, para designar genéticamente a los gemelos dicigotos de ternera, en contraposición a los gemelos monocigotos (17). Fue Ford en 1956 el primero en utilizar el término en el ámbito del trasplante (18). Así, un ejemplo de quimera biológica sería la presencia de células hematológicas de un donante en un organismo receptor. La coexistencia de células de donante y receptor en SP o MO constituiría el llamado quimerismo hematopoyético (19).

A lo largo de la historia del TPH se han empleado distintos métodos de cuantificación del quimerismo (Tabla 1), que han ido mejorando en sensibilidad y capacidad de cuantificación (20,21). En el momento actual, la técnica estándar es la PCR de microsatélites (PCR-STR), un método sencillo, barato, fiable y con una sensibilidad en torno al 1 % (22,23). En los últimos años, se están estudiando nuevos métodos (PCR cuantitativa [qPCR], PCR digital [ddPCR], *Next Generation Sequencing* [NGS]), que logran aumentar la sensibilidad hasta por debajo del 0,01 %.

Técnica	Ventajas	Inconvenientes	Sensibilidad	Aplicabilidad
RFLP	Muy informativa	Tiempo, laboriosa	5-10 %	Alta
Citogenética	Informativa en neoplasias con alteraciones citogenéticas	Tiempo	5 %	Baja
Fenotipo eritrocitario	Simple, precisa	Latencia larga, específica de linaje, interferida por transfusión	1-5 %	Alta
FISH X/Y	Pocos falsos positivos, gran número de células, sensibilidad alta	Sólo para TPHs con disparidad de sexo	0,1-0,001 %	Baja
PCR-STR fluorescente	Robusta, rápida, gran exactitud cuantitativa, requerimiento reducido de ADN, posibilidad de PCR múltiple	Sensibilidad moderada, picos sombra (" <i>stutter peaks</i> "), amplificación preferencial de alelos	1-5 %	Muy alta
PCR-STR en linajes	Muy alta sensibilidad	Laboriosa, cara	0,1-0,001 %	Muy alta
qPCR SNPs	Alta sensibilidad, rápida, poco laboriosa, alta especificidad en cr. Y	Falsos positivos, requiere <i>screening</i> previo D/R, requiere PCR específica por cada SNP, menor capacidad de cuantificación, requiere validación en cada prueba	0,1 %	Media-alta
qPCR indels	Alta sensibilidad, rápida, poco laboriosa	Requiere <i>screening</i> previo D/R, requiere PCR específica por cada indel, menor capacidad de cuantificación, requiere validación en cada prueba	0,01 %	Alta
ddPCR indels	Alta sensibilidad, alta precisión, no requiere curva de calibración, podría permitir el empleo de un sólo indel	Requiere <i>screening</i> previo D/R, requiere PCR específica por cada indel, variabilidad experimental (requiere hacer por duplicado)	0,01 %	Alta
NGS	Alta correlación con STR, probable alta sensibilidad	Cara, sin validar	En estudio	Alta

Tabla 1.- Resumen de técnicas de cuantificación del quimerismo. Modificado de Bader P, *et al.* (21)
RFLP: Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción. **FISH:** Hibridación fluorescente *in situ*. **SNP:** polimorfismos de un sólo nucleótido. **D/R:** donante/receptor. **Indels:** polimorfismos de inserción/delección.

Originalmente se pensaba que la adquisición de QC era esencial para mantener el injerto tras un alo-TPH (24). Sin embargo, en las últimas décadas y con la aparición de nuevas modalidades de TPH, se ha visto que en ciertas situaciones pueden coexistir las células de donante y de receptor (quimerismo mixto, QM), siendo un proceso dinámico (21). Sin embargo, en función de las características del paciente, de su enfermedad de base, del acondicionamiento empleado, de la profilaxis de EICR, de la fuente de PH, del momento del TPH y de la situación concreta del paciente en el momento de su determinación, el significado clínico de la cuantificación del quimerismo será diferente.

De esta forma, podrían darse tres situaciones diferentes (21):

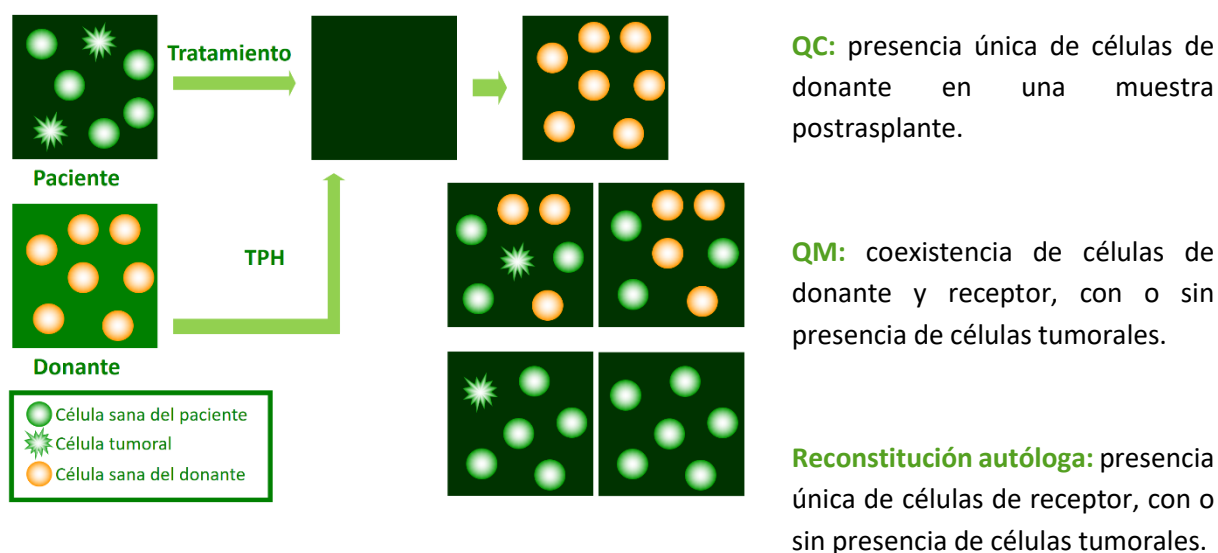


Figura 7.- Representación esquemática de las situaciones de quimerismo postrasplante. Imagen cortesía del Dr. Ismael Buño

Asimismo, dentro del espectro del QM, podemos referirnos a su dinámica en función de si el porcentaje de células del receptor aumenta, disminuye o se mantiene estable (21). Este concepto dinámico reviste una gran importancia, ya que es bien conocido que entraña valor pronóstico, como se explicará más adelante en los apartados de *Quimerismo y fracaso del injerto* y de *Quimerismo y recaída* (25–27).

b) Quimerismo y linajes leucocitarios

Dentro del sistema hematopoyético existen varios tipos celulares que derivan de la célula madre hematopoyética (Figura 8). Cada uno de ellos tiene funciones diferenciadas y en el ámbito del TPH el resultado esperado es la sustitución de todos ellos por células del donante.

La separación de linajes leucocitarios mediante tecnología inmunomagnética se describió por primera vez a finales de los años 80 (28) y comenzó a emplearse en el ámbito del quimerismo a principios de los 90 (29,30). Así, se pudo observar que cuando se analizaba el resultado del quimerismo en las distintas subpoblaciones leucocitarias por separado, algunos pacientes presentaban QC en algún compartimento y mantenían QM en otros. Esta situación se definió como quimerismo disociado, o *split chimerism* en inglés (31).

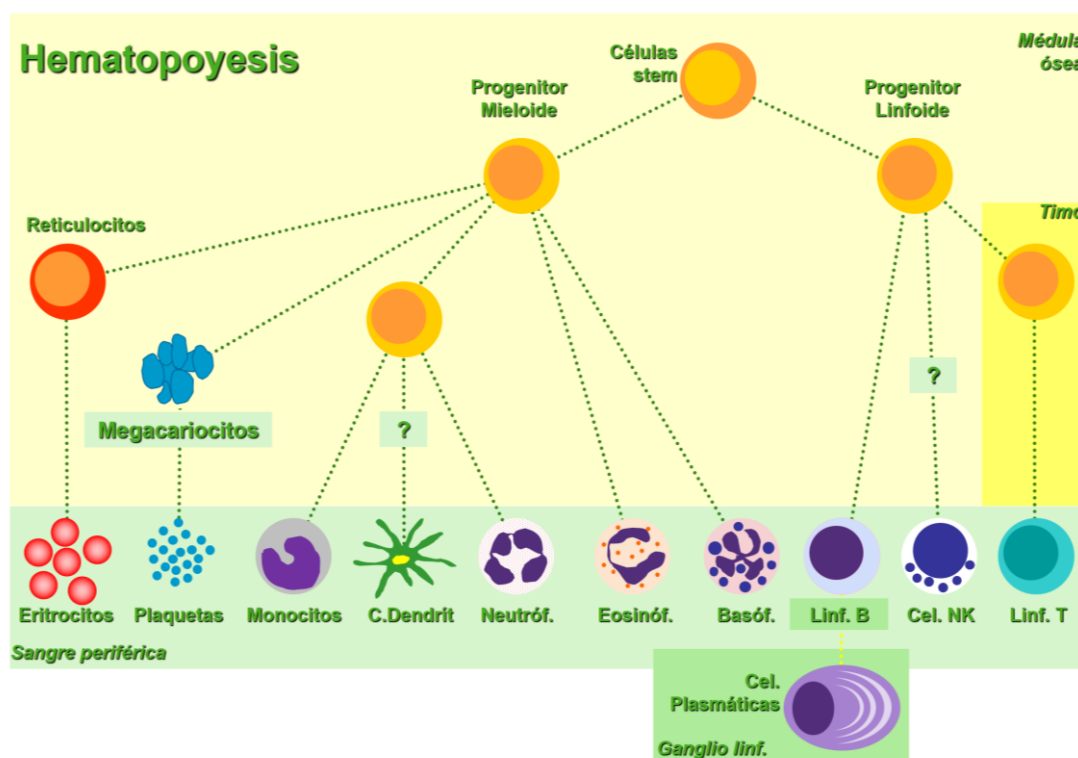


Figura 8.- Representación esquemática de la hematopoyesis

Por otro lado, también se observó que pacientes que presentaban QC en las muestras de sangre total, podrían presentar QM en alguno de los linajes leucocitarios, sobre todo en aquellos que recibían alo-TPHs con AIR. Esto se debía a un aumento de sensibilidad de la prueba asociada a la separación inmunomagnética, ya que esta permitía analizar una mayor cantidad de células para cada compartimento, detectándose cantidades muy pequeñas de células del receptor que no se observaban cuando dichas células se encontraban diluidas en el resto de tipos celulares (29,31). De este modo, comenzaron a realizarse estudios para explorar el significado biológico del quimerismo en cada linaje celular en el seno del TPH.

La separación de poblaciones celulares para el análisis del quimerismo se realiza hoy en día en la mayoría de centros mediante esferas imantadas marcadas con un anticuerpo monoclonal específico de la línea celular que se desee estudiar. Este método permite la separación de células con una pureza superior al 95 %. En la Figura 9 se muestra un análisis de pureza mediante citometría de flujo de una muestra de LT separados con tecnología inmunomagnética, en este caso se observa que el 98,76 % de las células son LT.

Los LT constituyen el linaje más estudiado en el ámbito del quimerismo. Con el auge de los AIR apareció un interés creciente en el estudio de esta subpoblación, debido a la observación de que los pacientes que recibían este tipo de acondicionamiento podían permanecer en QM en LT durante mucho tiempo después del alo-TPH. De esta manera comenzaron a estudiarse los factores que influían en la adquisición del quimerismo en LT y su relación con los resultados del TPH, ampliándose estos estudios progresivamente a otros linajes celulares.

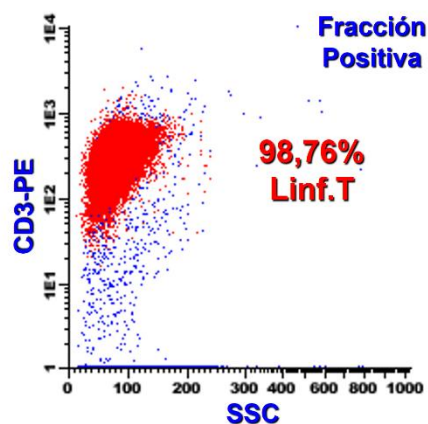


Figura 9.- Pureza de fracciones linfocitarias (LT) separadas por tecnología inmunomagnética. Hospital Gregorio Marañón, Madrid.

c) Factores pretrasplante que influyen en la dinámica del quimerismo

En los últimos años se han descrito múltiples factores que influyen en la dinámica del quimerismo, especialmente en los LT. Debido a la gran heterogeneidad de los estudios en aspectos tales como el paciente, la enfermedad de base, el esquema de acondicionamiento, la fuente de CPH y la manipulación de las mismas, o el esquema de profilaxis de EICR, los resultados de estos trabajos son a menudo contradictorios y no resulta sencillo extrapolarlos a la población general de pacientes. Probablemente sea cada centro el que deba estudiar la influencia de los factores pretrasplante en el quimerismo de sus pacientes (32,33).

Sin embargo, algunos de los factores se encuentran asociados con el quimerismo de forma reiterativa en varios estudios. Uno de ellos sería la enfermedad de base, ya que los pacientes con neoplasias linfoides presentan más frecuentemente QC en SP y LT que los pacientes con neoplasias mieloides (33–35). Esto podría venir explicado por los tratamientos recibidos previamente al TPH, ya que en líneas generales los pacientes con neoplasias mieloides tienen indicación de recibir alo-TPH en primera o segunda respuesta completa (RC) según las guías, mientras que en los pacientes con neoplasias linfoides está indicado en recaídas más tardías, y normalmente tras haber recibido un TPH autólogo. Esta última observación estaría en concordancia con otro de los factores más frecuentemente relacionado con la adquisición de QC, como es la intensidad de tratamiento recibido previamente al TPH. Así, los pacientes que han recibido QT intensiva antes del TPH presentan mayores tasas de QC respecto a los que no (34,36). Por otro lado, los pacientes que han recibido más de dos líneas de QT también tienen más probabilidad de presentar QC (32,37). De la misma manera, parece lógico pensar que el acondicionamiento también está relacionado con la adquisición de QC, concretamente el empleo de irradiación corporal total (ICT) (35,38,39) o de melfalán (37,40) parecen favorecer la instauración de QC de células del donante. Por último, existen varios trabajos que

encuentran una correlación directa entre la celularidad del inóculo infundido y la adquisición de QC (32,34,36,41,42).

En la Tabla 2 se recoge un resumen de los factores pretrasplante cuya relación ha sido más estudiada con el quimerismo en SP, en LT y en otros linajes celulares.

Factor	Descripción	Referencias
Edad	<i>La edad avanzada en el receptor se relaciona con más QM*</i>	Panse, 2005 (41)
	<i>Más edad al TPH se relaciona con QC en pacientes pediátricos</i>	Elkaim, 2014 (43)
Enfermedad de base	<i>Más QC en LT en patología linfóide y LMA que en SMD ó LMC</i>	Baron, 2004 (34)
	<i>Más QM a día +90 en LT en patología mieloide que en otras patologías</i>	Mohty, 2007 (35)
	<i>Más QC en LT en leucemias mieloides que en leucemias linfoides (LLA, LLC)</i>	Boeck, 2006 (44)
	<i>Más QC en SP en pacientes con linfoma que en pacientes con SMD</i>	Mickelson, 2011 (33)
	<i>Más QC en SP en pacientes con enfermedades malignas</i>	Elkaim, 2014 (43)
Líneas de tratamiento previo	<i>Más QC en LT, granulocitos y monocitos en pacientes que habían recibido QT intensiva</i>	Baron, 2004 (34)
	<i>Más QC en SP a día +30 en pacientes que habían recibido más de 2 líneas de QT previas</i>	Valcárcel, 2003 (37)
	<i>Más QC en CM y en LT a día +45 si habían recibido QT previa</i>	Carvallo, 2004 (36)
	<i>Más QC en LT en pacientes que habían recibido más de 2 líneas de QT previas</i>	Saito, 2008 (32)
Acondicionamiento	<i>Más QC en LT a día +30 y +90 en FluMel que en FluBu</i>	Valcárcel, 2003 (37)
	<i>Más QM en LT en ICT que ICT fraccionada</i>	Mattsson, 2003 (38)
	<i>Más QC en LT, NK y CM en el día +28 en pacientes que habían recibido ICT en el acondicionamiento</i>	Miura, 2006 (39)
	<i>La adición de fludarabina o de TPH autólogo previo a un acondicionamiento no mieloablativo con ICT (2 Gy) aumenta la tasa de QC en LT a día +28</i>	Panse, 2005 (41)
	<i>Más QC en LT en acondicionamiento con irradiación linfóide total respecto a ICT de baja dosis o basado en ATG</i>	Mohty, 2007 (35)
	<i>Más QM con dosis de melfalán 90-130 frente a >135 mg/m²</i>	Imahashi, 2015 (40)
Donante	<i>Más QC en SP en DNE que en DE</i>	Boeck, 2006 (44)
	<i>Más QC en SP con más disparidad HLA en TPH de SCU</i>	Elkaim, 2014 (43)
Fuente de PH	<i>Más QC en LT en TPHs de SP que de MO</i>	Baron, 2004 (34)
Contenido inóculo	<i>Más QC en LT a mayor número de LT, monocitos y células NK en injerto</i>	Baron, 2004 (34)
	<i>Más QC en monocitos a mayor número de células CD34+ y monocitos en injerto</i>	
	<i>Más QC en CM a mayor número de CD34+ en injerto</i>	Carvallo, 2004 (36)

Contenido inóculo	Correlación entre CNT y CD3+ en inóculo y QC en LT a día +30	Saito, 2008 (32)
	Correlación entre CD34+ en inóculo y QC en granulocitos	
	El contenido en CNT y en células NK en el inóculo se correlaciona con el quimerismo en LT a día +28	Panse, 2005 (41)
	Más QC en LT en TPH sin depleción T que en depleción con alemtuzumab + complemento	Roux, 1996 (42)

*(En este estudio la edad del receptor se encontraba correlacionada con la edad del donante)

Tabla 2.- Factores que influyen en la dinámica del quimerismo. QC: quimerismo completo. QM: quimerismo mixto. LT: linfocitos T. SP: sangre periférica. MO: médula ósea. CM: células mieloides. LMA: leucemia aguda mieloblástica. SMD: síndrome mielodisplásico. LMC: leucemia mieloide crónica. LLA: leucemia aguda linfoblástica. LLC: leucemia linfática crónica. ICT: irradiación corporal total. FluMel: acondicionamiento basado en fludarabina y melfalán. FluBu: acondicionamiento basado en fludarabina y busulfán. DNE: donante no emparentado. DE: donante emparentado. CNT: células nucleadas totales. CD3+: células CD3+.

d) Dinámica del quimerismo en linajes leucocitarios y evaluación del prendimiento

Una de las aplicaciones clínicas del quimerismo en el postrasplante precoz es la monitorización del prendimiento. Se conoce como “prendimiento”, “implante” o “injerto” la recuperación de cifras hemoperiféricas tras un TPH autólogo o alogénico. Normalmente se define el prendimiento de neutrófilos como el primer día de recuento absoluto en SP por encima de $0,5 \times 10^9/L$ durante tres días consecutivos (12), que en el alo-TPH suele situarse entre las dos y tres semanas de haber realizado la infusión de CPH.

En 1999, Dubovsky y colaboradores (45) realizaron un estudio exhaustivo de la relación del quimerismo con el prendimiento, obteniendo resultados sorprendentes. Se analizó el quimerismo en SP total en intervalos de 1 a 3 días durante el primer mes postrasplante en 66 alo-TPHs pediátricos. Se detectó que en el día +8 ya hay más células circulantes del donante que del receptor. Así, se definió en este artículo el término “prendimiento molecular” como el primer día en que aparece más material genético de donante que de receptor en muestras de SP, demostrándose que el prendimiento molecular precedía al prendimiento hematológico en 7 días (con recuentos totales de leucocitos inferiores a $200/\mu L$), y observándose un aumento progresivo de las células del donante en SP desde el momento de la infusión (Figura 10).

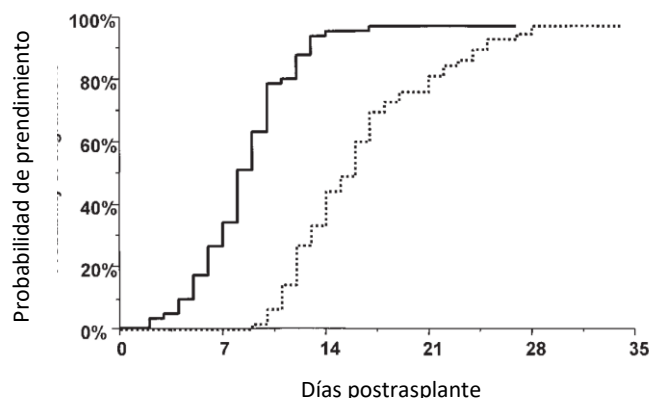


Figura 10.- Probabilidad de prendimiento molecular (línea continua) y hematológico (línea discontinua) después del alo-TPH. Traducido de Dubovsky, *et al.* (26)

Existen otros estudios que analizan la dinámica del quimerismo en linajes celulares en relación con el prendimiento, si bien en ellos no se hace una recogida de muestras tan exhaustiva como en el estudio de Dubovsky. En 1999, Childs y colaboradores (46) describieron el quimerismo a día +14 y a día +30 postrasplante en LT (CD3+) y células mieloides (CM, CD14+CD15+) en 15 pacientes que recibieron alo-TPH de SP de DE con AIR con fludarabina y ciclofosfamida y profilaxis de EICR sólo con ciclosporina. En el día +14 el porcentaje de células del donante en LT era mayor que en CM en todos los pacientes. En el día +30 había un aumento progresivo de ambos porcentajes (Figura 11).

En 2004, Baron y colaboradores (34) realizaron un estudio para describir la cinética del quimerismo en linajes leucocitarios (monocitos, granulocitos, NK y LT) en 120 pacientes que habían recibido un AIR (ICT 2 Gy con o sin fludarabina) y profilaxis de EICR con ciclosporina y MMF. Se extrajeron muestras de SP cada dos semanas hasta el día 56 postrasplante. En la muestra del día 14, se observaba que el linaje leucocitario con mayor proporción de ADN del donante eran las NK (70 %), seguido por los LT (69 %), monocitos (56 %) y granulocitos (12 %) (Figura 11), sin que se encontrara correlación entre las dinámicas de los mismos. El aumento más significativo se produjo en el compartimento de los granulocitos en el día +28 (90 %), con un aumento progresivo de todos los demás linajes en las sucesivas muestras. La mayoría de los pacientes permanecía en QM en alguno de los compartimentos leucocitarios hasta el día +180.

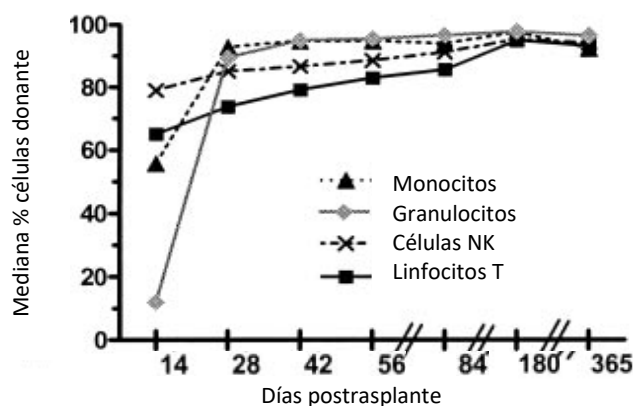


Figura 11.- Cinética del prendimiento postrasplante con AIR. Traducido de Baron, *et al.* (34)

En el año 2001, Mattsson (47) describió el quimerismo en una cohorte de 30 pacientes que recibieron TPH de SP de DE ó DNE HLA idéntico comparando cuatro regímenes diferentes de acondicionamientos no mieloablativo. La mediana de adquisición de QC fue de 90 días en LT, 39 días en LB, y 46 días en CM. De la misma manera, existen otros trabajos que muestran QC más precozmente en granulocitos o en SP total que en LT (37,48).

En el estudio de Saito *et al.* (32), en el que se analizaron 177 pacientes con AIR basado en busulfán, el 43 % de los pacientes presentaba a día +30 QM en LT, mientras que el 92 % presentaba QC en granulocitos. Los pacientes que presentaban menos del 60 % de LT del donante a día +30 presentaban más riesgo de fracaso primario del injerto.

Existen varios trabajos que relacionan el análisis precoz del quimerismo con el fracaso del injerto. De esta manera, la identificación de pacientes con alto riesgo de esta complicación permitiría tomar medidas en la inmunomodulación para tratar de revertir esta situación. Uno de estos trabajos es el de Dubovsky (45), en el que los pacientes que en el día +14 no presentaban más células del donante que del receptor evolucionaban a fracaso del injerto. Similares resultados arrojaron otros estudios en quimerismo precoz en SP, LT y NK y su relación con fallo primario del implante (34,43,49–52) o incluso con fracaso tardío del injerto (48). Nuestro grupo publicó un trabajo en 2004 reportando dos casos del fracaso secundario del injerto. En ambos se observó más del 70 % de linfocitos T y más del 20 % de células en SP del receptor en el momento de establecer este diagnóstico, con recuperación de cifras hemoperiféricas y restablecimiento del QC tras tratamiento con ILD (53).

e) Quimerismo y EICR

Probablemente la EICR sea el factor más estudiado en relación al quimerismo, especialmente en los LT. Así, a lo largo de la década de los 90 se comenzó a describir una mayor incidencia de EICR aguda (EICRa) en los pacientes que estaban en QC en LT (46,54,55) (Figura 12), pero esto también se relacionó con mayor EICT (46). Si bien hubo algunos estudios que no encontraron asociación entre el quimerismo y el desarrollo de EICRa (33,44), hubo otros que describieron correlación entre el QC en LT a día +30 y la aparición de EICRa en el contexto del TPH con acondicionamiento no mieloablativo (34,35,39,51). Del mismo modo, también en este tipo de acondicionamiento se describió el “efecto protector” frente a la EICR de permanecer en QM en el compartimento de los LT (56,57). En la misma línea algunos trabajos consiguieron encontrar asociación entre el quimerismo en LT y el desarrollo de EICR crónica (EICRc) (33,58). En la Tabla 3 se presenta un resumen de los estudios más importantes en este campo.

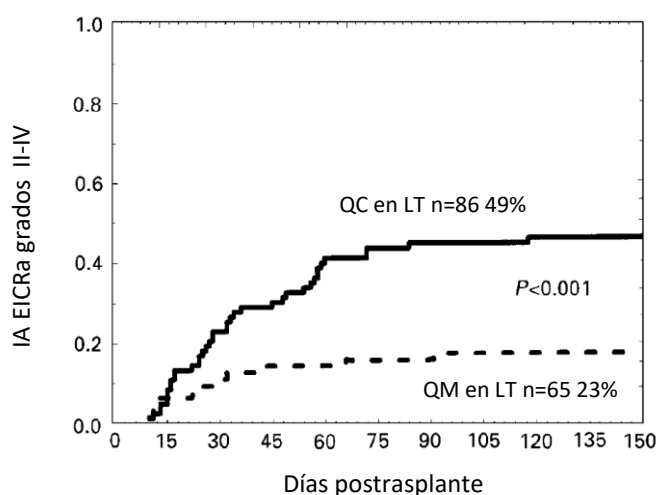


Figura 12.- IA de EICRa grados II-IV en pacientes con QC en LT respecto a pacientes con QM en LT. Traducido de Mattsson, *et al.* (54)

En el año 2014, Jiang *et al.* (59) publicaron un estudio interesante, ya que no estaba limitado a pacientes con AIR. En él se encontró que los pacientes que presentaban más de 69 % de LT del donante en SP muy precozmente (a día +7) tenían más riesgo de desarrollar EICRa.

Nuestro grupo también publicó en 2015 (60) un estudio en 68 pacientes con distintas neoplasias hematológicas en el que se analizaba la adquisición de QC en LT y en LT activados (LA, CD25+). Los pacientes que presentaban QC en LA a día +30 tenían mayor incidencia de EICRa. Por otra parte, aquellos pacientes que presentaban QC más precoz en LA que en LT también presentaban un mayor riesgo de desarrollo de EICRa.

Factor	Descripción	Pacientes	Referencia
EICRa	<i>EICRa en 20 % de los pacientes en QM en LT frente a 55 % de los pacientes en QC en LT</i>	60	Bertheas, 1991 (55)
EICRa, EICT	<i>Sólo apareció EICRa y EICT en pacientes con QC en LT</i>	15	Childs, 1999 (46)
EICR	<i>La mayoría de pacientes con AIR que desarrollaron EICR estaban en QM</i>	30	Mattsson, 2001 (47)
EICRa	<i>% células del donante a día +28 en LT y EICRa</i>	35	McSweeney, 2001 (51)
EICRa	<i>Correlación entre % células del donante a día +28 en LT y EICRa Sin embargo, la mayoría tenían QM al diagnóstico de EICR</i>	120	Baron, 2004 (34)
No relación	<i>No relación entre quimerismo en LT y células dendríticas en el momento del prendimiento y EICR, recaída o supervivencia</i>	144	Boeck, 2006 (44)
EICRa	<i>Relación entre >50 % donante en LT a día +14 y EICRa grado II-IV en los pacientes con AIR Relación entre QC en LT a día +28 y EICRa</i>	70	Miura, 2006 (39)
EICRa	<i>Más EICRa en los que tenían QC en LT a día +30</i>	102	Mohty, 2007 (35)
EICR	<i>QM en LT se asoció con menos EICRa y sobre todo EICRc</i>	120	Van Besien, 2009(57)
EICR	<i>Aumento de LT del donante >5 % entre determinaciones y desarrollo de EICRa y de EICRc Relación entre QC en LT a día +30 y EICRc extensa</i>	33	Rupa-Matysek, 2011 (58)
No relación	<i>El QC no se relacionaba con riesgo de EICRa o EICRc, fallo del injerto, recaída o mortalidad</i>	233	Mickelson, 2011 (33)
EICRa	<i>El QC en LT se asociaba con el desarrollo de EICRa y EICRa extensa</i>		
EICRa	<i>>69 % de LT del donante a día +7 se relaciona con EICRa</i>	124	Jiang, 2014 (59)
EICR	<i>Presentar QC en cualquier momento tras TPH de SCU se relaciona con más EICRa y con EICRc</i>	94	Elkaim, 2014 (43)
EICRa	<i>Mayor incidencia de EICRa en pacientes en QC en LT activados CD25+ a día +30</i>	68	Martínez-Laperche, 2015 (60)
EICRa	<i>Menos EICRa en los que tenían QM en LT a los 3 y 6 meses</i>	143	Thompson, 2017 (56)

Tabla 3.- Correlación entre quimerismo y EICR. EICRa: Enfermedad Injerto Contra Receptor aguda. EICRc: Enfermedad Injerto Contra Receptor Crónica. EICT: Enfermedad Injerto Contra Tumor. QM: quimerismo mixto. QC: quimerismo completo. LT: linfocitos T. AIR: acondicionamiento de intensidad reducida. SCU: sangre de cordón umbilical.

f) Quimerismo y recaída

i. Quimerismo en MO y linaje leucémico

Es lógico pensar que, si la recaída hematológica se encuentra precedida de una reaparición de células autólogas, es posible que dichas células se correspondan con células de la enfermedad de base. Esto se hace especialmente interesante en pacientes en los que no existen marcadores aberrantes moleculares o por citometría de flujo que permitan detectar niveles bajos de células tumorales.

En un estudio de 2004 de Lamba *et al.* (61), se analizó el resultado del quimerismo en MO en 80 pacientes con neoplasias hematológicas que habían recibido alo-TPH fundamentalmente de MO de DE ó DNE, HLA idénticos o con disparidad, en muestras recogidas a 30, 90 y 365 días postrasplante. Observaron que 8/16 pacientes que estaban en QM a día +30 pasaban a QC a día +90. Este fenómeno ya estaba descrito en otros estudios (62,63). Por otro lado, 7/53 pacientes que estaban en QC a día +30, pasaban a tener QM a día +90. Sin embargo, había otros pacientes (3/53) con “quimerismo intermitente”, que presentaban QC a día +30, QM a día +90 y de nuevo QC a día +365, sin que en este estudio se relacionara con recaída.

En el año 2009, Bornhäuser y colaboradores (64) estudiaron el quimerismo en células CD34+ (CD34+) en la SP de 90 pacientes con leucemia aguda y síndrome mielodisplásico (SMD) que habían recibido un alo-TPH. Los pacientes que presentaban QM o disminución del porcentaje de ADN del donante en CD34+ presentaban mayor riesgo de recaída y una peor supervivencia. El intervalo entre el porcentaje de células del donante inferior al 80 % y la recaída fue de 61 días (Figura 13). Estos resultados se confirmaron posteriormente para neoplasias mieloides en otros estudios empleando el quimerismo en CD34+ en SP (65) o en MO (66).

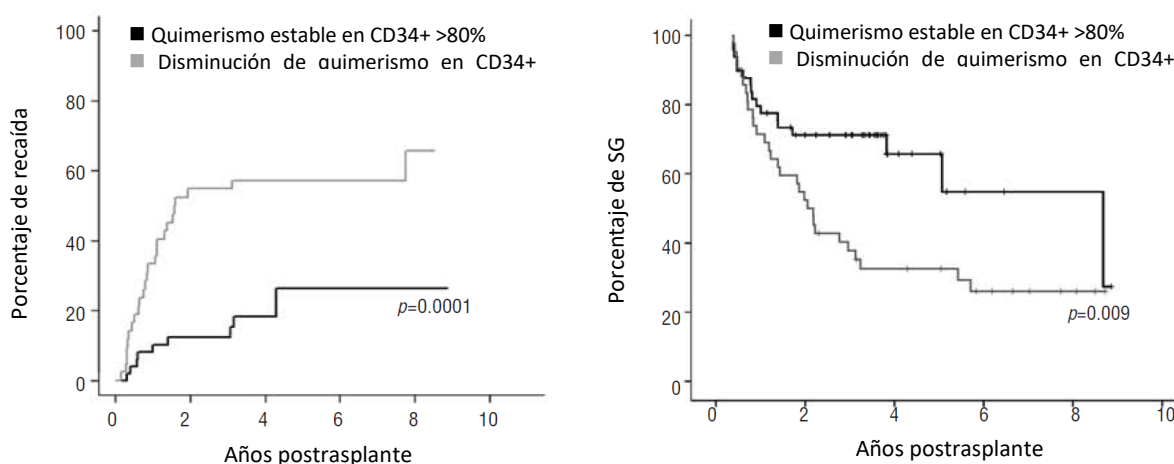


Figura 13.- IA de recaída (izquierda) y SG (derecha) según el quimerismo en células CD34+. Traducido de Bornhäuser, *et al* (64).

En cuanto al quimerismo en linaje leucémico en leucemia linfoblástica aguda (LLA), existen varios estudios que demuestran su utilidad. El grupo de Shanghai (67) publicó en el año 2015 los resultados del análisis de la dinámica del quimerismo en LB en 31 pacientes con diagnóstico de LLA-B. El aumento de LB del receptor en MO se asoció con recaída en los pacientes con LLA-B (valor predictivo positivo 11 %), siendo estadísticamente significativo al compararlo con los pacientes que no recayeron. Similares resultados se presentan en una cohorte amplia de 162 pacientes pediátricos de LLA el estudio de Preuner *et al.* (68) mediante monitorización del quimerismo en CD34+ y en células T citotóxicas CD3+CD8+ en SP.

De este modo, y en la misma línea que el grupo pediátrico alemán, el grupo sueco del Dr. Mattsson realizó varios estudios de seguimiento de linaje leucémico en SP y anticipación de recaída en LLA-B (69) y neoplasias mieloides (70).

ii. Quimerismo en SP y LT

En cuanto al quimerismo en SP y la recaída, existen resultados contradictorios, sobre todo en el ámbito de los TPHs con AIR o con depleción T, ya que en muchos de ellos no se encuentra relación entre el QM y mayor incidencia de recaída (33,38,44,71). En este contexto, una de las hipótesis sería que estas diferencias vinieran dadas por el tipo de patología estudiada y su sensibilidad al EICT. Este efecto podría ser mucho más importante en el mantenimiento de la respuesta postrasplante en los pacientes con LMC que en aquellos con LLA ó leucemia mieloblástica aguda (LMA). Así lo reportó Roux en 1994 en 48 pacientes que recibieron TPH con depleción T y en los que el QM se asociaba con recaída sólo en los pacientes de LMC (72). Estos resultados serían concordantes con otros estudios en pacientes con LMC en los que el QM se asociaba con la positividad de enfermedad mínima residual (EMR) (30) o una mayor incidencia de recaída (55,73). Otra de las hipótesis para explicar estas discrepancias podría ser la diferencia entre analizar el quimerismo en un punto concreto de la evolución del paciente o analizarlo como un continuo para estudiar su dinámica, aspecto que se tratará más adelante.

Existen varios estudios que relacionan el estado del quimerismo en un determinado momento postrasplante con la incidencia posterior de recaída. Así, Imahashi *et al.* (40) describieron que los pacientes que presentaban QM en SP a día +14 tenían un riesgo aumentado de recaída. De forma similar, el estudio de Mohty *et al.* (35) encontró que los pacientes que adquirían QC en LT de forma tardía presentaban mayor incidencia de recaída (Figura 14). Otros estudios encontraron dicha correlación con análisis del quimerismo en puntos más tardíos después del TPH, probablemente por la naturaleza crónica de las enfermedades de base de los pacientes. Uno de ellos (56) encontró que los pacientes con leucemia linfática crónica (LLC) que habían recibido un TPH con AIR, presentaban más riesgo de recaída en aquellos que permanecían en QM en LT a los 3 y a los 6 meses postrasplante. De la misma manera, otro estudio (74) halló correlación entre el QM en LT entre los 3 y los 4 meses postrasplante y la incidencia de recaída sólo en los pacientes con SMD.

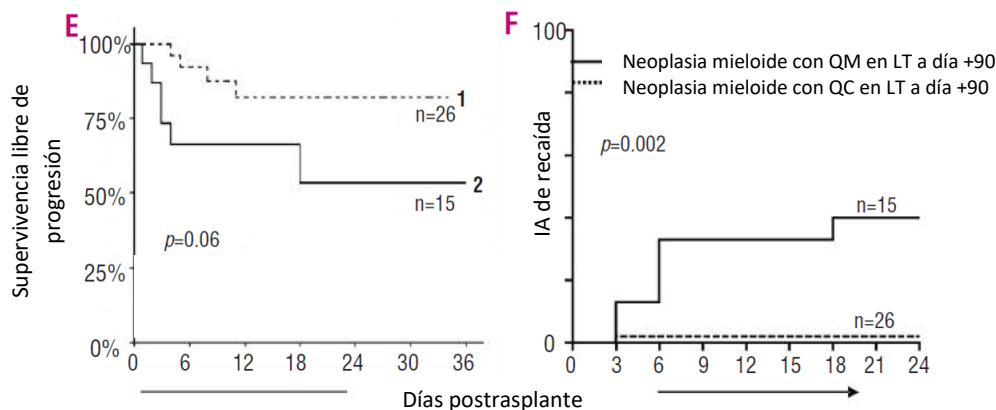


Figura 14.- Estimación de Kaplan Meier para supervivencia libre de progresión (E) e IA de recaída (F) en pacientes con neoplasias mieloides según el quimerismo en LT a día +90. Traducido de Mohty, et al. (35)

iii. Dinámica del quimerismo y recaída

Otros estudios se han centrado en el análisis de la dinámica del quimerismo en vez de analizar un valor fijo en un punto concreto. En esta línea se encuentran los estudios del Dr. Bader y colaboradores del Hospital Infantil de Tübingen, Alemania (25–27,63,75). En estos trabajos se describieron tres tipos de pacientes dentro de los que presentaban QM: 1) los que presentaban porcentajes ascendentes de células del receptor, 2) los que presentaban descenso progresivo de células del receptor 3) los que se mantenían en niveles similares entre determinaciones. Describieron también que cuando los pacientes que se encontraban en QC recaían, lo hacían presentando previamente un intervalo de tiempo de QM, que no se detectaba si no se hacían determinaciones muy frecuentes (63). De este modo, realizaron otro estudio de monitorización exhaustiva ampliando el número de pacientes y homogeneizando los diagnósticos de base y los resultados concluyeron que la probabilidad de supervivencia libre de progresión era del 67 % en pacientes en QC (n=36), 100 % para pacientes con descenso progresivo de células del receptor (n=8), y 10 % para los pacientes con aumento de células del receptor (n=10) (75) (Figura 15).

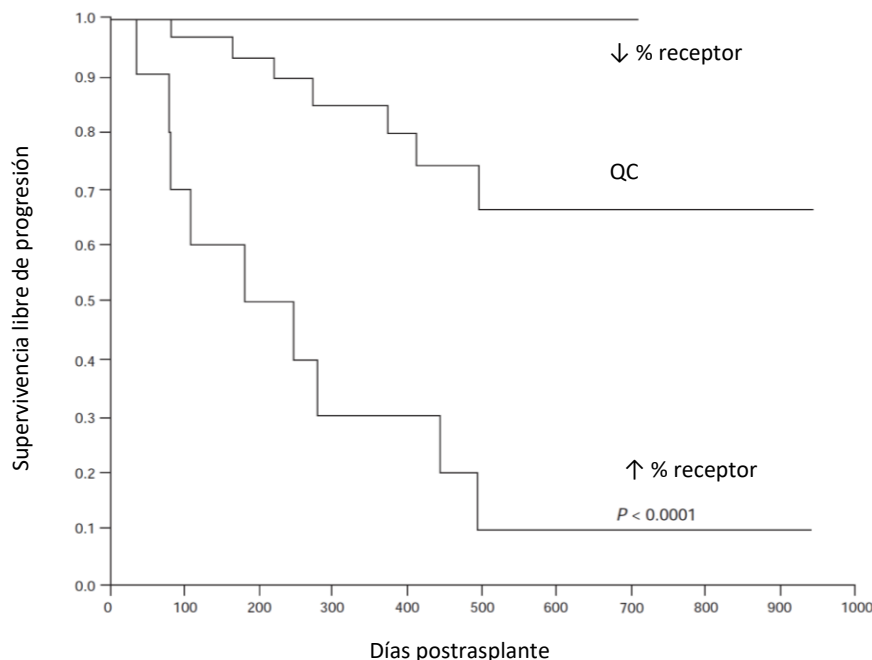


Figura 15.- Estimación de Kaplan Meier para supervivencia libre de progresión en pacientes en QC y QM con aumento o disminución de células del receptor. Traducido de Bader, *et al.* (75)

Basándose en estos resultados diseñaron un estudio piloto en pacientes con diagnóstico de LMA, LLA o SMD en los que se tomaban medidas de inmunomodulación (disminución de la inmunosupresión o ILD) en los pacientes con aumento de células del receptor, con respuestas de larga duración en 7 de los 12 pacientes (27). Realizaron entonces otros dos trabajos analizando los resultados en cohortes más amplias de LMA (26) y LLA (25) demostrando que los pacientes con aumento de células del receptor en los que no se tomaba ninguna medida mostraban una supervivencia muy pobre, pero algunos de los que se trataban se conseguían rescatar (Figura 16). Estos resultados son mejores que los publicados en la literatura previa de tratamiento con ILDs en pacientes con recaída hematológica franca (8 % de los pacientes con LLA y 22 % de pacientes con LMA) (76–78). Además, otras publicaciones reflejan que las ILDs son más efectivas cuando se administran después de QT (33 % en LMA y 37 % en LLA), lo cual sugiere que son más efectivas en situaciones de baja carga tumoral y por este motivo darían buen resultado en el contexto que propone el equipo de Tübingen (79,80). De este modo, se elaboraron unas guías de manejo de pacientes con aumento de células del receptor basadas en los estudios comentados previamente (21).

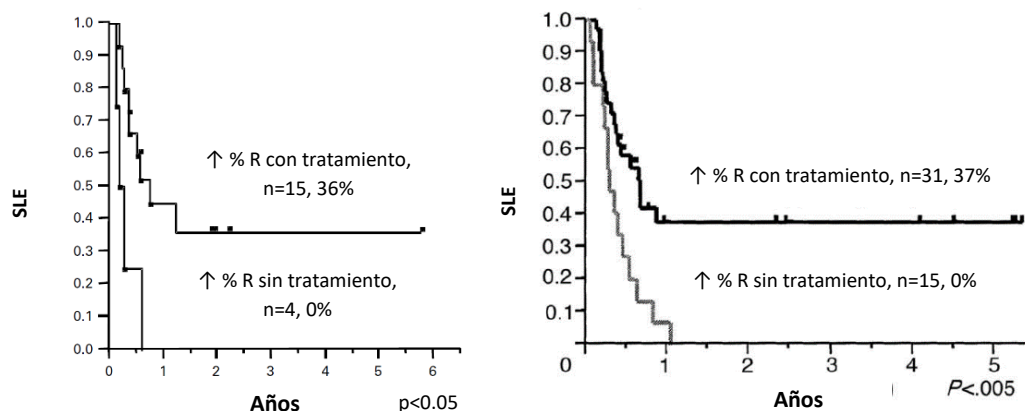


Figura 16.- Estimación de Kaplan Meier para supervivencia libre de evento (SLE) en pacientes en con aumento de progresivo del porcentaje de células del receptor con o sin tratamiento inmunomodulador para pacientes con LMA (izquierda) o LLA (derecha). Traducido de Bader, *et al.* (25,26)

Estos resultados se confirmaron en otros trabajos de análisis de dinámica del quimerismo y recaída (57,65,67,81–83). Todos ellos fueron estudios con intervalos de seguimiento relativamente cortos, en los que, sobre todo en pacientes con leucemias agudas, la recaída hematológica franca estaba precedida por un estado de reaparición de células autólogas. Sin embargo, otros trabajos con seguimiento menos exhaustivo o en los que no se analizaba la dinámica no encontraron relación entre quimerismo y recaída (84–86). Esto sugiere que es muy importante un seguimiento estrecho, así como la separación de grupos de pacientes en función de si la dinámica es ascendente, descendente o estable. Es probable que estos últimos estudios con intervalos de seguimiento relativamente largos pierdan la detección del estado crítico de QM que precede a la recaída.

g) Quimerismo y supervivencia

Independientemente de los eventos postrasplante mencionados previamente, en algunos estudios se encontró una relación directa entre el quimerismo y la SG de los pacientes. Esta asociación se ha demostrado en varios compartimentos celulares. Así, se ha encontrado una peor supervivencia en los pacientes acondicionados con fludarabina y melfalán que presentaban QM en SP a día +14 (40). En la misma línea, también se ha demostrado que, en pacientes que recibían AIR, presentar menos de 50 % de NK del donante a día +15 y menos de 90 % de NK y de CM del donante a día +28 se relacionaba con peor SG al año (39). Otros estudios han demostrado relación del QM con la supervivencia en el compartimento de LT a día +30 (32) y en MO a día +90 (61). Sin embargo, en pacientes con aplasia medular la mejor supervivencia parece darse en los pacientes que presentaban QM estable, los cuales no presentaban EICR, siendo la peor supervivencia para los pacientes con QM ascendente, que tenían más riesgo de fracaso del injerto (87).

h) Recomendaciones actuales en quimerismo

Existen pocas guías clínicas de recomendaciones de monitorización del quimerismo. En cuanto a la técnica, la PCR-STR parece el *gold standard* y la técnica más globalmente empleada a día de hoy, si bien algunos centros emplean aproximaciones basadas en qPCR (20,21). A lo largo de los años, ha habido descripciones técnicas de varios sistemas de realización de la PCR-STR (88–91). Sin embargo, en 2012 el grupo europeo publicó un panel de microsatélites diseñado para monitorización del quimerismo con el objeto de estandarizar la técnica y homogeneizar los resultados entre centros (22). En esta línea, en 2015 el grupo británico publicó unas guías nacionales de recomendaciones técnicas para procesamiento, análisis y posterior informe de los resultados del quimerismo (23).

En cuanto a recomendaciones de seguimiento, el único consenso publicado para monitorización del quimerismo es el resultado de la *Tandem Meeting* de 2001 (31). En esta publicación la técnica recomendada sería la PCR-STR ó la PCR-VNTR, realizándose el seguimiento preferiblemente en SP. Se debería considerar la realización de quimerismo en linajes leucocitarios en los pacientes con AIR. Las recomendaciones de monitorización variarían en función del acondicionamiento empleado. De esta manera, el análisis del quimerismo no sería obligatorio para seguimiento de TPHs con acondicionamiento mieloablativo (AMA), mientras que para TPHs no mieloablativos debería considerarse su realización cada 2-4 semanas con el objeto de anticipar complicaciones. En las enfermedades no neoplásicas, el quimerismo debería medirse al mes, a los dos meses y a los tres meses postrasplante. También debería monitorizarse el quimerismo en los meses 1, 3, 6, y 12 en los TPHs con depleción T, no mieloablativos o con nuevos regímenes de profilaxis de EICR.

Existen otras dos publicaciones de recomendaciones basadas en la experiencia de un centro y los protocolos asistenciales establecidos en el mismo. Una de ellas es la del grupo de TPH pediátrico de Tübingen (21), en la que se recomienda la realización de quimerismo de forma semanal hasta adquisición de QC en los pacientes con leucemias agudas hasta el día +200 y posteriormente de forma mensual, y en enfermedades no malignas o en linfomas de forma semanal hasta adquisición de QC y posteriormente cada 2-3 meses hasta 2 años tras el TPH. Se presentó en este trabajo un algoritmo de actuación en caso de detección de aumento progresivo de células del receptor, en cuyo caso se valorarían estrategias de inmunomodulación (retirada de inmunosupresión o ILD). Nueve años después, el mismo grupo publicó otras recomendaciones específicas para pacientes con SMD (92). En este se planteaba una estrategia diferente en función del riesgo, con mediciones muy frecuentes para pacientes de alto riesgo, en los cuales se debía tener en consideración el empleo de técnicas más sensibles basadas en qPCR. La otra aproximación la publicó el grupo pediátrico de Viena en el seno de un estudio de dinámica del quimerismo en LT y NK y riesgo de fracaso del injerto (49). En ésta, se proponen estrategias de seguimiento e inmunomodulación en función del resultado del quimerismo precoz en estas subpoblaciones.

En el ámbito nacional hay un capítulo dedicado a quimerismo en el Manual Práctico de Genética Hematológica (19). En este se recomienda la realización de determinaciones seriadas en el postrasplante temprano, idealmente cada 2 semanas hasta adquisición de QC. Se propone así la siguiente tabla de interpretación:

	Quimerismo	EMR	Prendimiento	Sospecha
Primeros 90 días post-TPH	QC SP, LT y CM	Negativa	Sí	EICRa
	QC SP y CM QM LT (disminución %R)	Negativa	Sí	(Ninguna)
	QM SP, CM y LT (aumento %R o RA)	Negativa	No	Fracaso primario del injerto
	QM SP, CM y LT (aumento %R o RA)	Negativa	Pérdida progresiva tras prendimiento	Rechazo del injerto
	QM SP, LT y CM	Positiva	Sí	Progresión de la enfermedad
A partir de los 90 días post-TPH	QC SP, LT y CM	Negativa	Sí	EICRc
	Aparición de QM en SP ó MO	Negativa	Sí, pero descendente	Rechazo del injerto o recaída*
	Aparición de QM en SP ó MO	Positiva	No	Recaída

Tabla 4.- Interpretación clínica del resultado del quimerismo. * Posible baja sensibilidad del estudio de EMR o recaída extramedular. Extraída del Manual Práctico del Genética Hematológica (19).

No existen, por tanto, recomendaciones sólidas en cuanto al papel de las nuevas técnicas más sensibles, la frecuencia de monitorización, el compartimento o compartimentos en el que se debe analizar el quimerismo y si se debe cambiar la estrategia de monitorización o de manejo de los pacientes en función de estos resultados.

Hipótesis

La monitorización del quimerismo en SP, MO y diferentes linajes leucocitarios ayuda a la toma de decisiones en el manejo postrasplante, especialmente en cuanto al manejo de estrategias de inmunomodulación y contribuye a diseñar estrategias de intervención precoz para la prevención de complicaciones.

En esta línea se plantearon las siguientes hipótesis:

- 1) La dinámica de adquisición de QC no es homogénea entre la SP, la MO y los distintos subtipos celulares.
- 2) El estudio del quimerismo en poblaciones celulares especiales (linfocitos T, células mieloides, linfocitos B, células NK, linfocitos T reguladores, linfocitos T activados y células CD34+) aportan información de utilidad clínica.
- 3) La adquisición de QC en SP, MO y los distintos compartimentos celulares varía según las características del paciente y del propio procedimiento del TPH.
- 4) Los pacientes que reciben un alo-TPH de donante alternativo (SCU, haploidéntico), presentan una dinámica de adquisición de QC diferente.
- 5) El estatus del quimerismo en SP, MO y los distintos compartimentos celulares se correlaciona con el desarrollo de diferentes complicaciones postrasplante.

Objetivos

Objetivo global

El objetivo principal de este trabajo es la caracterización de la dinámica y utilidad clínica del quimerismo en SP, MO y linajes leucocitarios en 193 alo-TPHs realizados en el Hospital General Universitario Gregorio Marañón entre los años 2010 y 2015.

Objetivos específicos

- 1) Comparar la dinámica del quimerismo en SP, MO y linajes leucocitarios en la cohorte global de pacientes, en los distintos tipos de TPH, y en la cohorte de pacientes con diagnóstico de LMA.
- 2) Analizar las características de los pacientes y del TPH que puedan influir en la dinámica del quimerismo en SP, MO y linajes leucocitarios.
- 3) Establecer la relación entre la dinámica del quimerismo y las complicaciones postrasplante (EICRa, EICRc, recaída, mortalidad relacionada con el TPH [MRT] o SG).

Pacientes y métodos

1.- Definiciones

- **Injerto mieloide:** recuento absoluto de neutrófilos de $0,5 \times 10^9/L$ o más durante tres días consecutivos.
- **Injerto plaquetar:** recuento absoluto de plaquetas de $20 \times 10^9/L$ o más durante tres días consecutivos.
- **QC:** cuantificación relativa de ADN de receptor indetectable (sensibilidad 1 %) mediante la técnica de PCR-STR en SP total o en MO total, o inferior a 5 % mediante separación de linajes leucocitarios por tecnología inmunomagnética y análisis por PCR-STR.
- **QM:** cualquier detección de ADN de receptor mediante PCR-STR en SP total o en MO total, o cuantificación por encima de 5 % en linajes leucocitarios separados mediante tecnología inmunomagnética y analizados mediante PCR-STR.
- **Reconstitución autóloga:** detección de ADN únicamente del receptor mediante PCR-STR en SP o MO totales, o en linajes leucocitarios.
- **Fracaso primario del injerto:** ausencia de evidencia de injerto mieloide o plaquetar a día +28 en TPH de SP o de MO, o a día +42 en TPH de SCU.
- **Fracaso secundario del injerto:** pérdida de la hematopoyesis de al menos dos líneas celulares en pacientes que habían presentado previamente injerto hematopoyético en ausencia de causas que lo justifiquen.
- **Criterios de respuesta en leucemias agudas:** según los criterios de 2003 del Grupo de Trabajo Internacional para Diagnóstico, Estandarización de los Criterios de Respuesta, Resultados de Tratamiento y Estándares de Comunicación para Ensayos Clínicos en Leucemia Mieloide Aguda (93), y según los criterios de 2005 del Octavo Taller Internacional en Leucemia Aguda Linfoblástica del niño (“Reunión Ponte di Legno”) (94).
- **Criterios de respuesta en linfomas:** según la Clasificación de Lugano de 2015 para Evaluación Inicial, Estadificación y Evaluación de Respuesta en Linfomas de Hodgkin (LH) y en Linfomas no Hodgkin (LNH) (95).
- **Criterios de respuesta en LLC:** según los criterios de evaluación de respuesta de 2018 del Grupo Internacional de LLC (96).
- **Criterios de respuesta en SMD:** según los criterios de 2000 del Grupo de Trabajo Internacional para Estandarización de los Criterios de Respuesta en SMD (97).
- **Criterios de respuesta en síndromes mieloproliferativos/mielodisplásicos:** según la propuesta de 2015 del Consorcio Internacional para la Uniformidad de Criterios de Respuesta en Neoplasias Mieloproliferativas/Mielodisplásicas en adultos (98).
- **Criterios de respuesta en LMC:** según los criterios de 2013 de la European LeukemiaNet (99).
- **Criterios de respuesta en mielofibrosis:** según los criterios revisados de 2013 en el Informe de Consenso del Grupo Internacional para Investigación y Tratamiento en Neoplasias Mieloproliferativas y la European LeukemiaNet (100).
- **Criterios de respuesta en mieloma múltiple (MM):** según los criterios de 2016 para evaluación de respuesta y de EMR del Grupo Internacional de MM (101).

- **Criterios de respuesta en aplasia medular:** según los criterios publicados en 2000 por Bruce Camitta (102).
- **Enfermedad visible:** a efectos del análisis de los datos se consideró enfermedad visible cualquier situación distinta de la RC.
- **Gradación EICRa:** gradación por órganos según los criterios del consorcio MAGIC de 2016 (103).
- **Gradación EICRc:** según criterios del NIH Response Criteria Working Group 2014 (104).
- **Recaída:** reaparición de enfermedad en un paciente que previamente estaba en RC, según los criterios específicos para cada patología.
- **Evento:** recaída de la enfermedad de base o *exitus*.
- **Causas de *exitus*:**
 - EICR: en los pacientes que presentaban EICR activa con tratamiento inmunosupresor y fallecieron de una infección se consideró la EICR como causa de *exitus*.
 - MRT: cualquier causa de muerte derivada de complicaciones del TPH, incluyendo infecciones, EICR y segundas neoplasias.

2.- Pacientes

Se analizaron las muestras y se recogieron los datos clínicos de los 210 alo-TPHs en pacientes con distintas patologías hematológicas, realizados consecutivamente en el Hospital General Universitario Gregorio Marañón entre el 1 de enero de 2010 y el 31 de diciembre de 2015. Se excluyeron del análisis los pacientes que habían recibido un alo-TPH previamente (n=17), por lo que se analizaron los datos de un total de 193 alo-TPHs.

Las características de los alo-TPHs se encuentran recogidas en la Tabla 5.

Característica	Número	Característica	Número
N	193	Donante varón – n (%)	106 (55)
Sexo varón – n (%)	130 (67)	Receptor varón / donante mujer – n (%)	61 (32)
Edad (años) – mediana (rango)	45 (16-68)	Enfermedad visible al TPH – n (%)	83 (43)
Diagnóstico – n (%)		Edad donante (años) – mediana (rango)	41 (11-73)
○ Leucemia Aguda	92 (48)	Tipo donante – n (%)	
○ LMA	65 (34)	○ DE	57 (29)
○ LLA	24 (12)	○ DNE	39 (20)
○ Linfoma/LLC	51 (26)	○ SCU	25 (13)
○ LH	22 (11)	○ Haplo	72 (37)
○ LNH	29 (15)		
○ SMD-SMP	38 (20)		
○ Otros	12 (6)		
Líneas de QT previas – n (%)		Celularidad infundida – mediana (rango)	
○ 0	19 (10)		4,77 (0,04-11,4)
○ 1	71 (37)	○ CD34 ($\times 10^6/\text{kg}$)	
○ ≥ 2	103 (53)	○ CNT/kg ($\times 10^8/\text{kg}$)	6,76 (0,10-27,8)
Acondicionamiento – n (%)		Fuente de CPH – n (%)	
○ AIR	77 (40)	○ SP	152 (79)
○ AMA	116 (60)	○ MO	16 (8)
		○ SCU	25 (13)
TPH autólogo previo – n (%)	17 (9)	ICT – n (%)	7 (4)

Tabla 5.- Características de los alo-TPHs analizados

Dada la heterogeneidad de diagnósticos, respecto a la situación de la enfermedad al TPH, se definió enfermedad visible como cualquier situación distinta de la RC. En el siguiente gráfico (Figura 17) se detalla la situación de la enfermedad al TPH de todos los pacientes.

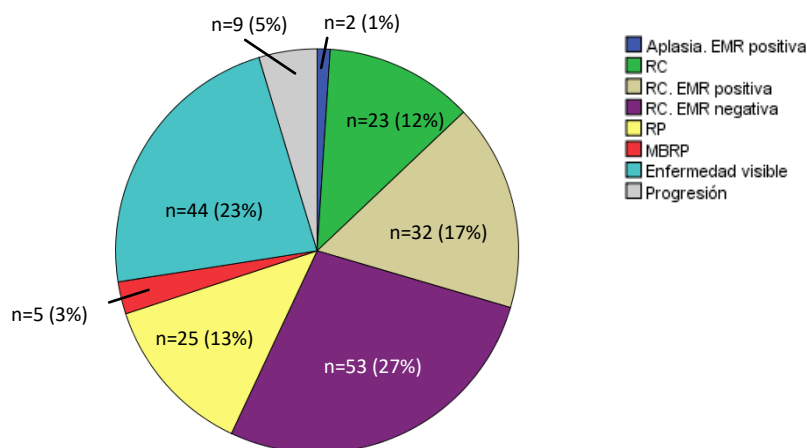


Figura 17.- Situación de la enfermedad al TPH

Respecto a los procedimientos, en la Tabla 6 se expone un resumen de las características del acondicionamiento y de la profilaxis de EICR empleada separados por tipo de donante empleado.

	DE n=57	DNE n=39	SCU n=25	Haplo n=72
Acondicionamiento:				
○ FluBu	36 (63 %)	33 (85 %)	0	25 (35 %)
○ FluBuCy	0	0	25 (100 %)	47 (65 %)
○ FluMel	10 (18 %)	4 (10 %)	0	0
○ Cy-ICT	7 (12 %)	2 (5 %)	0	0
○ Otros	4 (7 %)	0	0	0
Intensidad:				
○ AMA	36 (63 %)	32 (82 %)	21 (84 %)	27 (37 %)
○ AIR	21 (37 %)	7 (18 %)	4 (16 %)	45 (63 %)
Profilaxis EICR:				
○ CsA+Mtx	55 (97 %)	2 (5 %)	0	0
○ CsA+MMF+Cy	0	12 (31 %)	0	72 (100 %)
○ CsA+ATG+CE	0	0	25 (100 %)	0
○ CsA+Mtx+ATG	0	25 (64 %)	0	0
○ Otros	2 (3 %)	0	0	0

Tabla 6.- Acondicionamientos y profilaxis de EICR. Flu: fludarabina; Bu: busulfán; Cy: ciclofosfamida; Mel: melfalán; CsA: ciclosporina; Mtx: metotrexato; MMF: micofenolato mofetilo; ATG: globulina antitumoral; CE: corticoesteroides

A continuación, se presentan las características de los pacientes con diagnóstico de LMA, ya que parte de los análisis que se presentan a continuación se realizarán en este subgrupo (Tablas 7 y 8).

Característica	Número	Característica	Número
N	65	Donante varón – n (%)	37 (57)
Sexo varón – n (%)	33 (51)	Receptor varón / donante mujer – n (%)	14 (21)
Edad (años) – mediana (rango)	44 (19-68)	Enfermedad visible al TPH – n (%)	9 (14)
Edad donante (años) – mediana (rango)	39 (19-73)	Tipo donante – n (%)	
		○ DE	18 (28)
		○ DNE	16 (25)
		○ SCU	11 (17)
		○ Haplo	20 (31)
Líneas de QT previas – n (%)		Celularidad infundida – mediana (rango)	
○ 1	42 (65)	○ CD34 ($\times 10^6$ /kg)	4,82 (0,07-11,05)
○ ≥ 2	23 (35)	○ CNT/kg ($\times 10^8$ /kg)	6,54 (0,15-17,37)
Acondicionamiento – n (%)		Fuente de CPH – n (%)	
○ AIR	8 (12)	○ SP	50 (77)
○ AMA	57 (88)	○ MO	4 (6)
		○ SCU	11 (17)
TPH autólogo previo – n (%)	0	ICT – n (%)	0

Tabla 7.- Características de los pacientes con diagnóstico de LMA

	DE n=18	DNE n=16	SCU n=11	Haplo n=20
Acondicionamiento:				
○ FluBu	18	16	0	11
○ FluBuCy	0	0	11	9
Profilaxis EICR:				
○ CsA+Mtx	18	0	0	0
○ CsA+MMF+Cy	0	7	0	20
○ CsA+ATG+CE	0	0	11	0
○ CsA+Mtx+ATG	0	9	0	0

Tabla 8.- Acondicionamientos y profilaxis de EICR en los pacientes con diagnóstico de LMA. Flu: fludarabina; Bu: busulfán; Cy: ciclofosfamida; Mel: melfalán; CsA: ciclosporina; Mtx: metotrexato; MMF: micofenolato mofetilo; ATG: globulina antitimocítica; CE: corticoesteroides

3.- Estudios de quimerismo

El análisis del quimerismo se realizó de forma programada en todos los pacientes según se muestra en el cronograma de la Tabla 9. Se tomaron muestras de SP para análisis del quimerismo en SP total, LT, LB, CM, LT reguladores (Treg), LA y NK a partir del día +15 postrasplante y posteriormente cada 2 semanas hasta adquisición de QC. Una vez alcanzado QC se realizó estudio en SP junto con las reevaluaciones de MO (días +30, +90, +180 y +365). En algunos pacientes no se pudo realizar separación leucocitaria en el día +15 debido al pobre recuento leucocitario. En estos casos el análisis se realizó en LT y en SP total (o en SP total sólo) y se pospuso el quimerismo en poblaciones leucocitarias al momento en que hubiera un número adecuado de leucocitos.

En el TPH de SCU se analizó una muestra adicional correspondiente al día +7 postrasplante.

En los pacientes con diagnóstico de LMA se realizó un análisis más exhaustivo, mensual en la SP y con un estudio de MO adicional en el día 270.

En los pacientes con diagnóstico de linfoma sin infiltración medular, el seguimiento se realizó exclusivamente en SP.

Día	SP	MO	LT	LB	CM	CD34	Treg	LA	NK
7	^a								
15	X		X ^b	X ^b	X ^b		X ^b	X ^b	X ^b
30	X	X	X ^b	X ^b	X ^b	^c	X ^b	X ^b	X ^b
60	^d								
90	X	X				^c			
120	^d								
150	^d								
180	X	X				^c			
210	^d								
240	^d								
270	^d	^d				^c			
300	^d								
330	^d								
365	X	X				^c			
15 meses	^d								
18 meses	X	X				^c			
21 meses	^d								
24 meses	X	X				^c			

Tabla 9.- Cronograma de análisis del quimerismo. ^aSólo en alo-TPH de SCU; ^bRepetido cada 2 semanas hasta QC; ^cSólo en patologías con expresión de CD34; ^dSólo en leucemias agudas.

Después del segundo año y hasta el quinto año postrasplante el estudio se realizó de forma anual en SP, y en MO según criterio clínico.

4.- Muestras

Se realizó análisis del quimerismo en 1339 muestras de SP total, 452 muestras de MO total, 339 muestras de LT, 158 muestras de LB, 262 muestras de CM, 64 muestras de CD34+, 22 muestras de Treg, 96 muestras de LA, y 136 muestras de NK.

5.- Separación inmunomagnética y purificación del ADN

Se tomaron muestras frescas de SP o de MO. Se calculó el volumen de muestra necesario para obtener un mínimo de 10^7 células mononucleadas previo a la separación inmunomagnética.

Se separaron las células mononucleadas mediante gradiente de Ficoll. Posteriormente se procedió a realizar la purificación de linajes leucocitarios mediante separación inmunomagnética (*AutoMACS, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany*) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los anticuerpos empleados se resumen en la Tabla 10. Para la separación de LA se emplearon anticuerpos frente a CD3 y CD25 (doble selección positiva). La separación de Treg se empleó una mezcla de anticuerpos “anti-no-CD4+” (*CD4+ T Cell Biotin-Antibody Cocktail*) con anti CD8, CD14, CD16, CD19, CD56, CD123, TCR γ / y CD235a, realizando una selección de la fracción negativa y posteriormente sobre el producto obtenido se realizó selección de la fracción positiva de células CD25+ con el procedimiento descrito anteriormente.

En el caso de las CM, se preparó un *buffy coat* mediante centrifugación. Posteriormente se emplearon anticuerpos frente a CD15/CD33 para el aislamiento de las mismas.

Todos estos análisis también se realizaron empleando el equipo AutoMACS (*Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany*) según las instrucciones del fabricante. La pureza mínima de los productos obtenidos medida por citometría de flujo multiparamétrica fue del 95 %.

Linaje celular	Fuente de obtención	Marcador
LT	SP	CD3
LB	SP	CD19/CD20
CM	SP	CD15/CD33
CD34+	MO	CD34
LA	SP	CD3/CD25
Treg	SP	CD4/CD25
NK	SP	CD56

Tabla 10.- Linajes celulares y marcadores empleados

Para el análisis del quimerismo en SP o MO totales, se extrajo el ADN de forma automatizada empleando el kit de purificación de ADN *Maxwell 16 (Promega, Madison, WI)* siguiendo las instrucciones del fabricante. En el caso de que el paciente presentase menos de 200 leucocitos totales/mm³, la extracción de ADN se realizó de forma manual mediante columnas (*Qiagen*) siguiendo las instrucciones del fabricante.

En el caso de los linajes celulares, tras la separación inmunomagnética se procedió a la lisis de los leucocitos mediante proteinasa-K 100 mg/mL (*Sigma P-2308*) e incubación a 56°C durante dos horas (*Thermomixer Compact; Eppendorf*).

6.- Realización de la PCR y análisis de resultados

Se realizó la PCR con 2 ng de ADN genómico empleando el kit AmpFISTR SGM Plus (*Life Technologies, Foster City, CA*), el cual contiene 10 loci de microsatélites más el gen de amelogenina X-Y marcados en tres colores diferentes (azul, 5-FAM; verde, JOE; amarillo, NED). Los productos de amplificación de PCR se sometieron a análisis de fragmentos mediante electroforesis capilar en un analizador *Genetic Analyzer 3130xl (Life Technologies)* bajo las condiciones recomendadas por el fabricante.

Se cuantificó el quimerismo mediante el software *Genemapper 4.0 (Life Technologies)* empleando el área en píxeles bajo los picos alélicos para estimar la cantidad relativa de ADN de donante y de receptor (Figura 18).

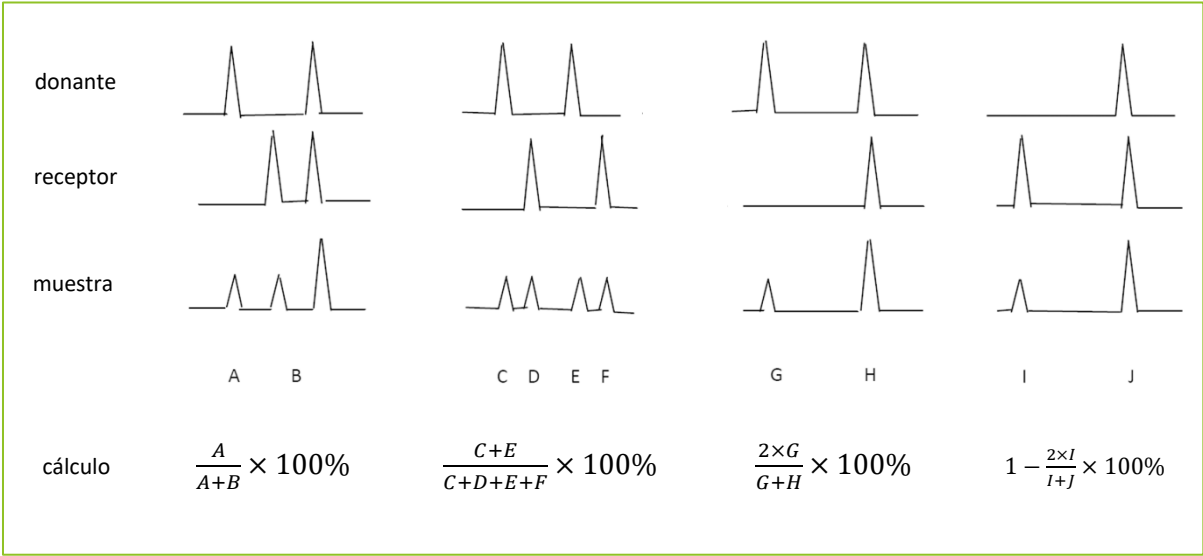


Figura 18.- Cuantificación de porcentaje de ADN de donante y receptor. Traducido de Jiang *et al.* (67)

7.- Análisis estadístico

Las variables cuantitativas se expresaron como mediana y rango. Las variables cuantitativas se expresaron como frecuencia y porcentaje.

Se censuró el seguimiento de quimerismo y de EICR cuando ocurrió alguno de los siguientes eventos: recaída, infusión de linfocitos del donante, fracaso del injerto, segundo TPH o muerte.

Para el estudio de la correlación de la adquisición de QC con los factores pretrasplante, aparte del análisis en la cohorte general de pacientes, se decidió realizar un subanálisis en la cohorte de pacientes con diagnóstico de LMA, con el objeto de evaluar los resultados en un subgrupo más homogéneo de pacientes. Esto es debido a que es la única patología para la cual el alo-TPH es un tratamiento estándar en primera o segunda línea. Se escogieron las variables según lo que se ha publicado hasta el momento en la literatura de posibles factores pretrasplante que podrían influir en la dinámica de adquisición de QC (edad, sexo de donante y receptor, fuente de CPH, donante empleado, diagnóstico de base, tratamientos recibidos, intensidad de acondicionamiento, profilaxis de EICR, celularidad infundida, estado de la enfermedad al TPH y estatus de serología CMV).

Dado el escaso número de pacientes en el grupo de patología no maligna (n=5), se decidió excluir dichos casos del análisis de correlación de quimerismo con el diagnóstico de base.

Para variables cuantitativas (edad, líneas de QT previas, CD34+ infundidas y CNT infundidas), se tomó como referencia la mediana en la cohorte global de pacientes. En cuanto a la profilaxis de EICR, como ésta es inherente al tipo de donante empleado, se compararon sólo los pacientes con TPH de DNE, ya que éste es el único grupo en el que los pacientes habían recibido dos tipos de profilaxis distintas (ATG+CsA+Mtx ó Cy+MMF).

Por otro lado, en el estudio de factores pretrasplante y quimerismo, dado el escaso número de pacientes con MO como fuente de PH en la cohorte de pacientes con LMA (n=4), se decidió excluir dichos casos del análisis. El estado de CMV tampoco se analizó en la cohorte de pacientes con LMA, debido al escaso número de pacientes con CMV negativo en donante y receptor (n=3).

La incidencia de adquisición de QC, aparición de EICR, recaída y MRT se estimaron mediante análisis de incidencia acumulada (IA). Se compararon las curvas mediante el test de log-rank. Se consideraron estadísticamente significativos los valores de $p < 0,05$.

El análisis multivariable de factores que influyen en la adquisición de QC se realizó mediante una regresión de riesgos competitivos. Se calculó la Hazard Ratio (intervalo de confianza 95 %) y se identificaron diferencias estadísticamente significativas. Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0,05$.

Se calculó la SG empleando el método de Kaplan-Meier. Se compararon las curvas mediante el test de log-rank. Se consideraron estadísticamente significativos los valores de $p < 0,05$.

El análisis descriptivo de los datos y de correlación se realizaron usando SPSS versión 21.0.0 para Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). El análisis estadístico de IA y supervivencia se realizó empleando R versión 3.4.2 para Windows (The R Foundation for Statistical Computing, Viena, Austria). El análisis multivariable de regresión de riesgos competitivos se calculó empleando el software STATA versión 15.1 para Windows (StataCorp, Texas, USA).

Resultados

1.- Quimerismo y prendimiento

a) Estudio descriptivo del prendimiento

Se evaluó el prendimiento en la cohorte global de pacientes, en la cohorte de pacientes con diagnóstico de LMA y según el tipo de donante empleado. Las medianas de prendimiento se muestran en la Tabla 11.

A)	Cohorte global	LMA
N	193	65
IA prendimiento neutrófilos (%)	185 (96)	63 (97)
○ Día – mediana (rango)	16 (10-46)	16 (10-27)
IA prendimiento plaquetas (%)	166 (86)	60 (92)
○ Día – mediana (rango)	18 (5-594)	16 (9-85)

B)	DE	DNE	SCU	Haplo
N	57	39	25	72
IA prendimiento neutrófilos (%)	57 (100)	38 (97)	20 (80)	70 (97)
○ Día – mediana (rango)	15 (11-33)	16 (10-26)	16 (10-46)	17 (13-28)
IA prendimiento plaquetas (%)	51 (89)	35 (90)	13 (52)	67 (93)
○ Día – mediana (rango)	11 (8-594)	14 (5-58)	37 (16-73)	29 (13-347)

Tabla 11.- Datos de prendimiento en el conjunto de pacientes y en los diagnosticados de LMA (A), así como por modalidad de TPH (B).

Al estudiar la IA de prendimiento de neutrófilos según el tipo de TPH, se encontraron diferencias estadísticamente significativas, con un prendimiento de neutrófilos más tardío para el TPH de SCU frente al DE y el DNE y para el TPH haploidéntico frente al DE y DNE. En la Figura 19 se representa gráficamente la IA de prendimiento de neutrófilos en la cohorte global y por tipo de donante. En la Tabla 12 se presenta la p resultante de la comparación de las curvas de IA entre los distintos tipos de donante. En cuanto al prendimiento de plaquetas, se encontró un prendimiento de plaquetas más lento en el TPH de SCU en comparación con el resto de donantes y una tendencia a prendimiento de plaquetas más lento en el TPH haploidéntico frente al TPH de DE y de DNE (Figura 20, Tabla 13).

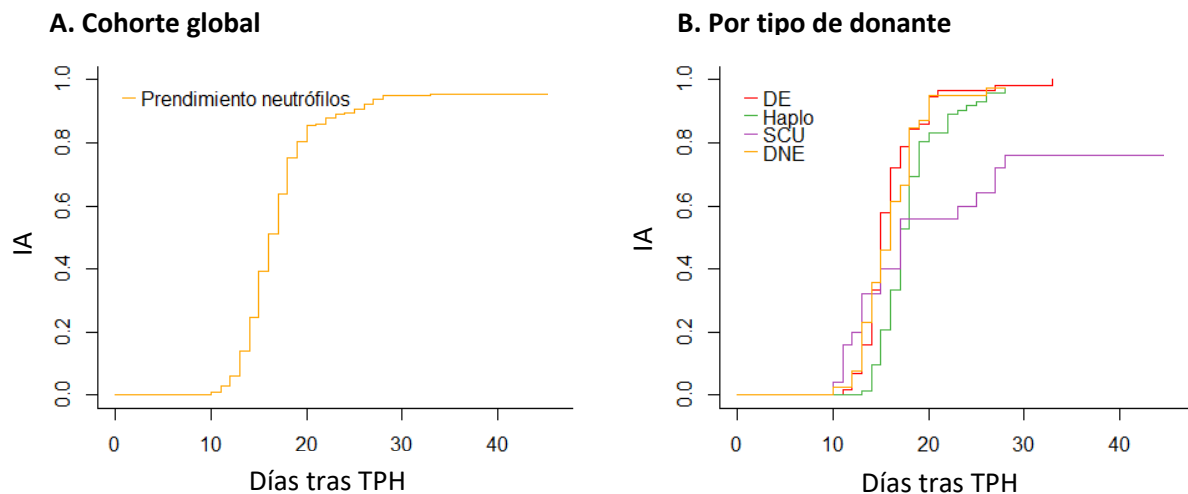


Figura 19.- IA de prendimiento de neutrófilos en la cohorte global (A) y por tipo de donante (B).

Tipo TPH (p)	DE	DNE	Haplo
SCU	<0,01	0,03	0,06
Haplo	<0,01	0,01	
DNE	0,65		

Tabla 12.- IA de prendimiento de neutrófilos según el tipo de donante.

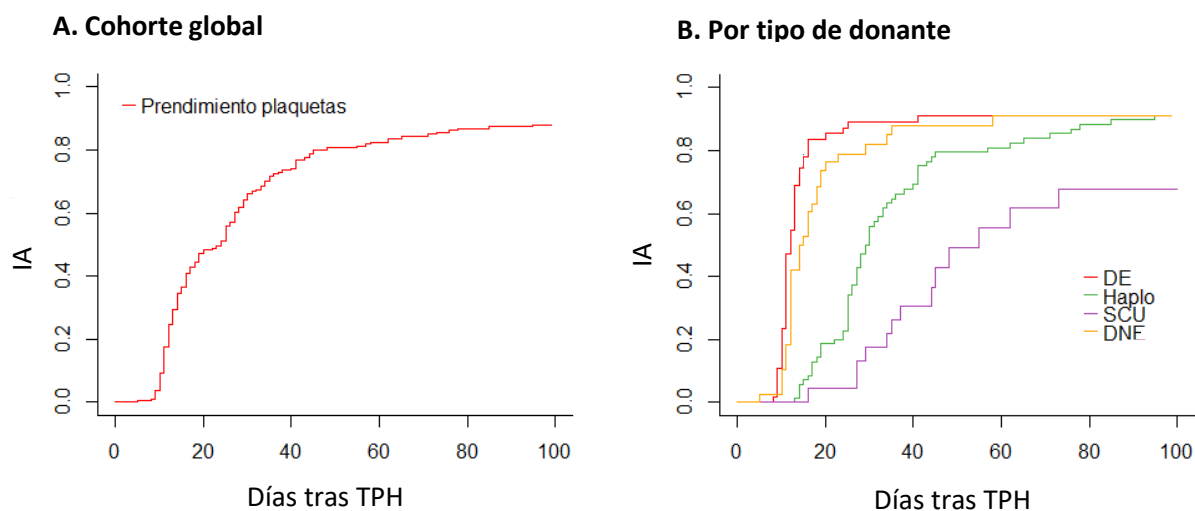


Figura 20.- IA de prendimiento de plaquetas en la cohorte global (A) y por tipo de donante (B).

Tipo TPH (p)	DE	DNE	Haplo
SCU	<0,01	<0,01	<0,01
Haplo	0,08	0,06	
DNE	0,09		

Tabla 13.- IA de prendimiento de plaquetas según el tipo de donante.

b) Adquisición de quimerismo completo en compartimentos celulares

i. Dinámica del quimerismo en sangre periférica, médula ósea y linajes celulares en la cohorte global

Se analizó la IA de QC en la SP total y comparativamente entre los distintos linajes analizados (LT, LB, CM, NK; Figura 21A). Resulta de especial interés que se encontró una **IA de QC más precoz en CM frente al resto de linajes**, y de LB y NK frente a LT (Tabla 14). Esto es, que los **LT fueron el linaje con adquisición más tardía de QC**.

Linaje (p)	CM	SP	LB	NK
LT	<0,01	0,09	<0,01	0,02
NK	<0,01	0,79	0,95	
LB	<0,01	0,54		
SP	<0,01			

Tabla 14.- Comparación de la IA de QC en SP y entre los principales linajes leucocitarios.

Respecto a la IA de QC entre las poblaciones linfocitarias T en la SP (LT totales, Tregs y LA), no se encontraron diferencias estadísticamente significativas (Figura 21B).

Sin embargo, se encontró que la **adquisición de QC es más temprana en SP que en MO** ($p < 0,01$; Figura 21C).

Por último, cuando se comparó la IA de QC entre MO total y CD34+, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas (Figura 21D).

Cuando se analizó la IA del quimerismo en linajes leucocitarios en la población de pacientes con diagnóstico de LMA, se encontraron resultados superponibles a los expuestos en la población global (datos no mostrados).

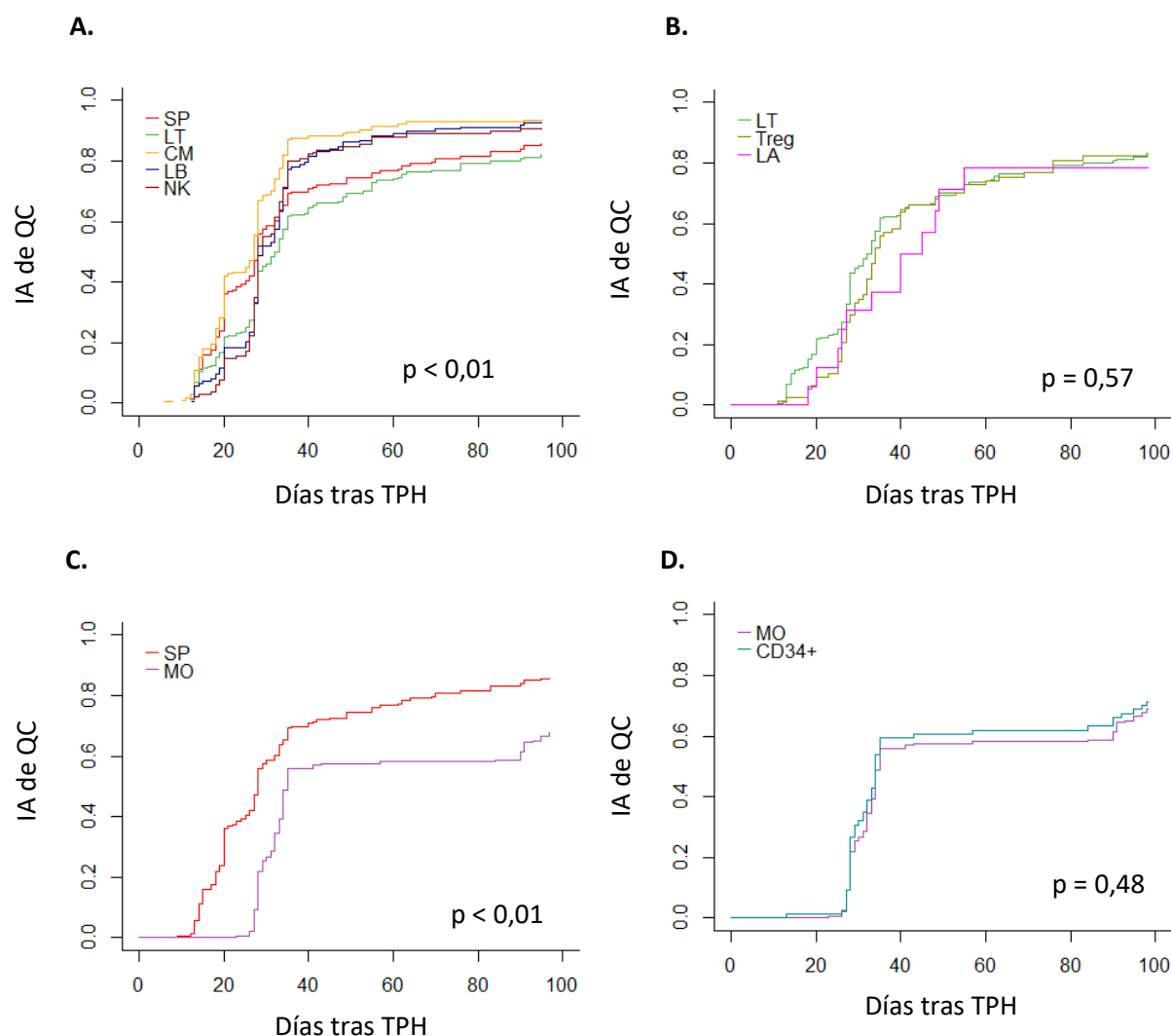
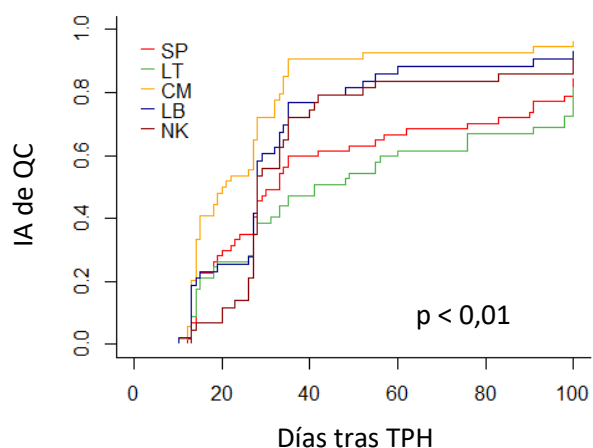


Figura 21.- IA de QC en los compartimentos celulares de la SP (A), en MO y CD34+ (B), en las poblaciones linfocitarias T (C) y en SP frente a MO (D). Es importante recordar que el análisis de quimerismo en SP total y linajes de SP se realizó a partir del día +15 (día +7 en TPH de SCU) y de forma semanal hasta QC, mientras que el análisis de quimerismo en MO y en CD34+ se realizó a día +30 y +90 (ver Pacientes y métodos).

ii. Dinámica del quimerismo en sangre periférica, médula ósea y linajes celulares según la modalidad de trasplante

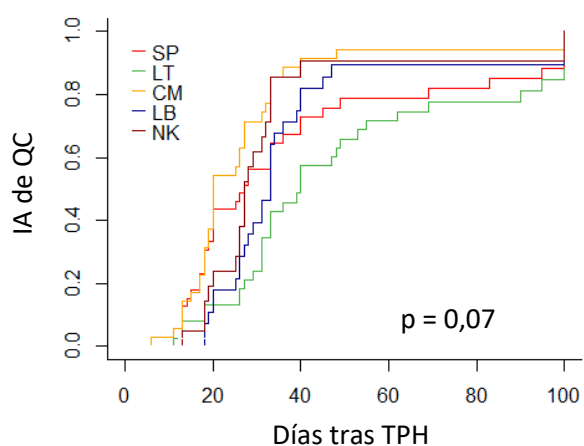
Se analizó la adquisición de QC en SP total, LT, CM, LB y NK según la modalidad de trasplante. Se encontró que en los **TPH de DE existía un QC más precoz en las CM** frente a SP, LT y NK ($p < 0,01$), y un **QC más tardío en LT** frente a LB ($p = 0,01$). En **TPH de DNE** se encontró un **QC más tardío en LT** frente a CM ($p = 0,01$), LB ($p = 0,05$) y NK ($p < 0,01$). No se encontraron diferencias entre los compartimentos celulares en el TPH haploidéntico y de SCU. Los resultados se presentan en la Figura 22.

A. TPH de DE



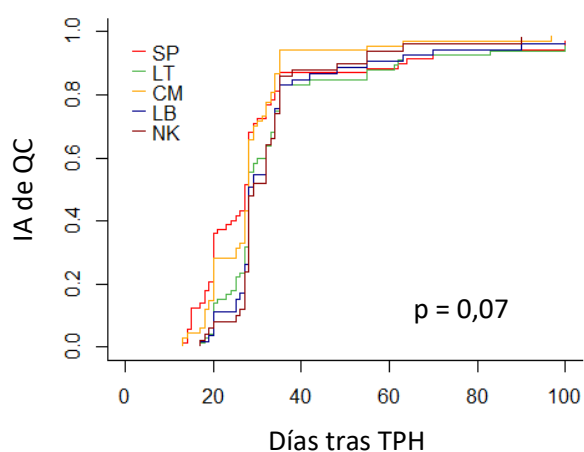
Linaje / p	CM	SP	LB	NK
LT	<0,01	0,43	0,01	0,08
NK	<0,01	0,43	0,48	
LB	0,07	0,10		
SP	<0,01			

B. TPH de DNE



Linaje / p	CM	SP	LB	NK
LT	0,01	0,10	0,05	<0,01
NK	0,34	0,53	0,18	
LB	0,07	0,86		
SP	0,11			

C. TPH haploidéntico



D. TPH de SCU

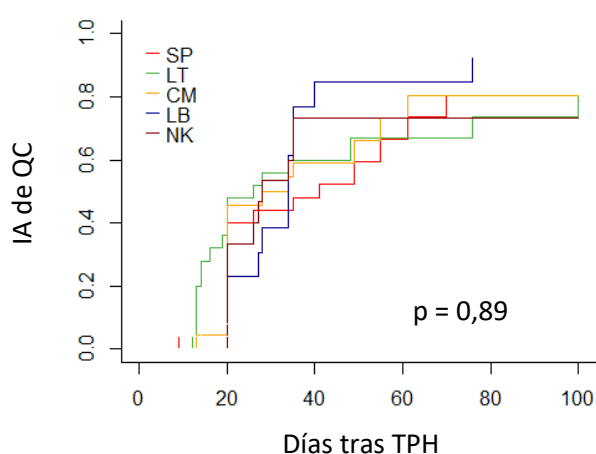


Figura 22.- IA de QC en los compartimentos celulares de la SP según el tipo de donante empleado: DE (A), DNE (B), Haplo (C) y SCU (D).

2.- Factores pretrasplante y quimerismo

A continuación, se presentan las diferentes características clínicas del paciente, enfermedad y del alo-TPH (enumeradas previamente en material y métodos) y su comparación con la adquisición de QC en SP, MO y en los linajes más representativos y con mayor número de casos disponibles para el análisis (LT, CM). Se presentan dichos análisis en cuatro subapartados separados (uno por cada linaje celular), mostrándose primero los resultados en la cohorte global de pacientes y a continuación los resultados en la cohorte de pacientes con diagnóstico de LMA.

a) Quimerismo en sangre periférica

A continuación, se muestran la influencia de distintos factores pretrasplante en la adquisición de QC en SP total (Tablas 15 y 16). Se encontró una adquisición de **QC más precoz** en pacientes con **TPH haploidéntico** frente a TPH de DE ($p<0,01$) y de SCU ($p=0,01$) y una tendencia a QC más precoz en pacientes con diagnóstico de MM ($p=0,05$).

Cohorte global	
Factor pretrasplante	p
Edad > 44,9 años	0,74
Receptor varón + donante mujer	0,14
Sexo donante	0,44
Sexo receptor	0,55
Fuente CPH	0,20
Fuente CPH (SP vs. SCU)	0,09
Tipo TPH	0,01
Patología de base	0,15
Diagnóstico linfoma	0,09
Diagnóstico leucemia	0,81
LMA vs. LLA	0,25
Diagnóstico SMD/SMP	0,17
Diagnóstico MM	0,05
TPH autólogo previo	0,15
QT previa	0,11
Líneas de QT < 2	0,38
AIR vs. AMA	0,14
Profilaxis EICR DNE	0,96

CD34+ infundidas $\leq 4,77$	0,76
CNT infundidas $\leq 6,76$	0,78
RC pretrasplante	0,35
CMV negativo	0,87

Tabla 15.- Estudio de la IA de QC en SP total en la cohorte global (n=193) según distintos factores pretrasplante.

Tipo TPH / p	Haplo	DNE	SCU
DNE	0,27		
SCU	0,01	0,11	
DE	<0,01	0,18	0,64

Tabla 16.- Estudio de la IA de QC en SP total en la cohorte global (n=193) según distintos tipos de donante.

A continuación, se presentan en forma de figura los resultados más relevantes del estudio de la IA de QC en SP en función de los factores pretrasplante (Figuras 23 y 24).

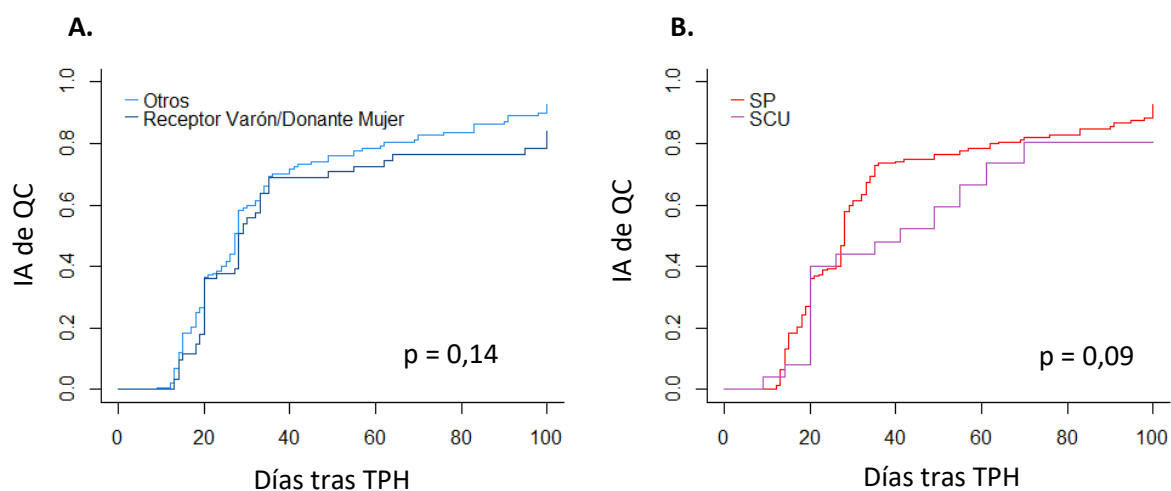


Figura 23.- IA de QC en SP en la cohorte global de pacientes (n=193) según la diferencia de sexo donante-receptor (A) y la fuente de PH (B).

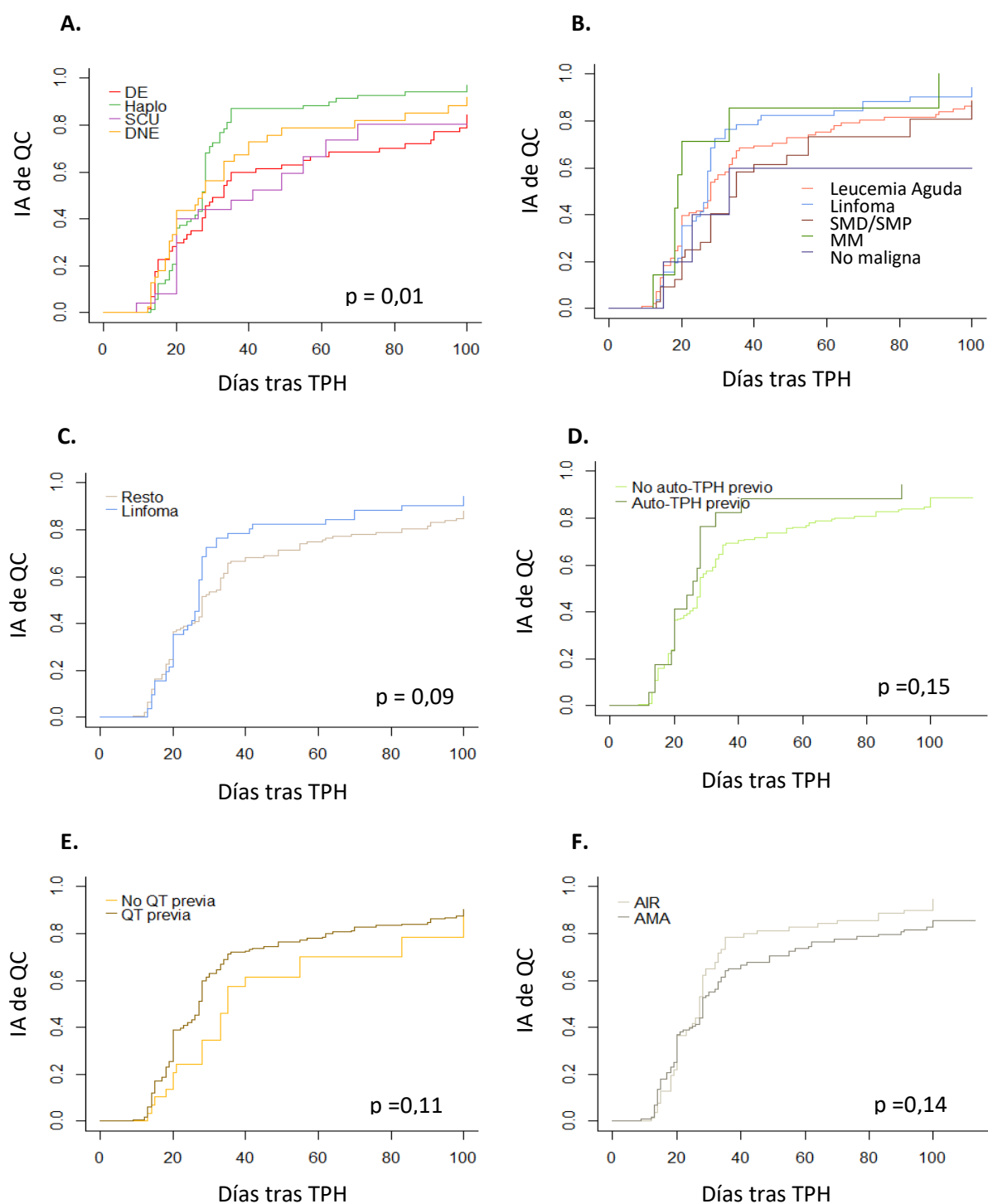


Figura 24.- IA de QC en SP en la cohorte global de pacientes (n=193) según el tipo de donante (A), el diagnóstico de base (B), el diagnóstico de linfoma frente al resto de patologías (C), haber recibido un TPH autólogo previo (D), haber recibido QT previa al TPH (E) y la intensidad de acondicionamiento (F).

En el **análisis multivariable**, se mantuvo la significación estadística en el **TPH haploidéntico** frente al resto (HR 1,47; p=0,02).

Se analizó también la influencia de los factores pretrasplante en la adquisición de QC en SP total en la cohorte de pacientes con **diagnóstico de LMA** (Tablas 17 y 18, Figura 25). También se encontró una adquisición de **QC más precoz** en los pacientes que recibían **TPH haploidéntico frente a DE** (p<0,01).

Cohorte LMA	
Factor pretrasplante	p
Edad > 44,9 años	0,85
Receptor varón + donante mujer	0,13
Sexo donante	0,46
Sexo receptor	0,65
Fuente CPH (SP vs. SCU)	0,86
Tipo TPH	0,01
AIR vs. AMA	0,97
CD34+ infundidas ≤ 4,77	0,48
CNT infundidas ≤ 6,76	0,19
RC pretrasplante	0,50

Tabla 17.- Estudio de la IA de QC en SP total en la cohorte de pacientes con diagnóstico de LMA (n=65) según distintos factores pretrasplante.

Tipo TPH (p)	Haplo	DNE	SCU
DNE	0,10		
SCU	0,10	0,55	
DE	<0,01	0,06	0,19

Tabla 18.- Estudio de la IA de QC en SP total en la cohorte de pacientes con diagnóstico de LMA (n=65) según distintos tipos de donante.

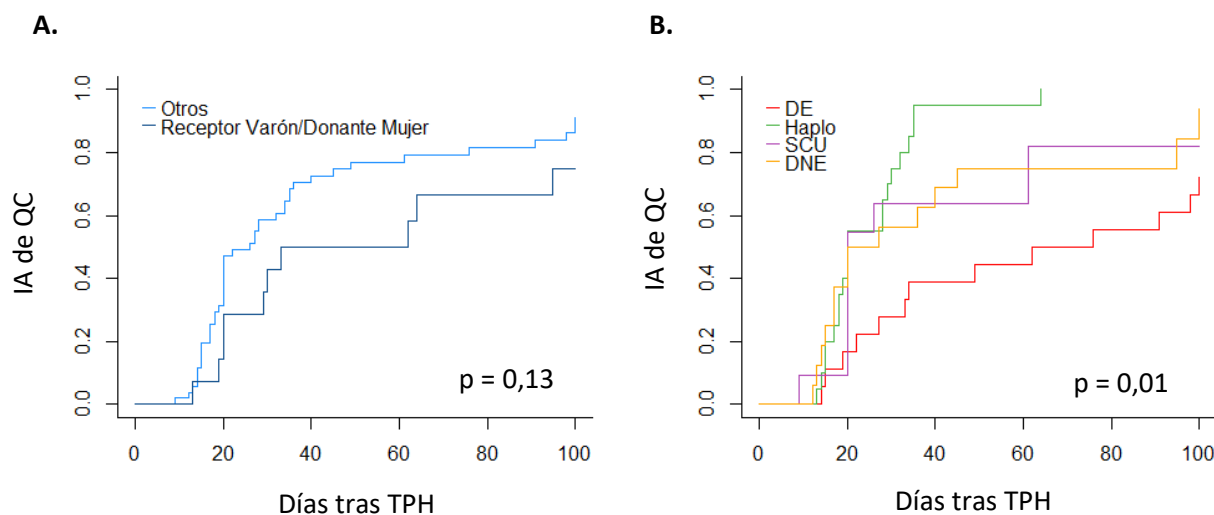


Figura 25.- IA de QC en SP en la cohorte de pacientes con diagnóstico de LMA (n=65) según el sexo de donante y receptor (A) y el tipo de donante (B).

b) Quimerismo en linfocitos T

Se analizó la influencia de factores pretrasplante en la adquisición de QC en LT, los cuales se presentan en las Tablas 19 y 20 y en la Figuras 26-28. Los pacientes que recibieron un **TPH haploidéntico** presentaron **QC en LT más precozmente** que los de DE ($p<0,01$) ó DNE ($p=0,01$). Se encontró un **QC más precoz en LT** en los pacientes con diagnóstico de **linfoma o de MM** frente al resto de pacientes ($p<0,01$) y en los pacientes con **LLA frente a LMA** ($p<0,01$). Se encontró un **QC más tardío en LT** en los pacientes con **SMD/SMP** frente al resto ($p<0,01$). Por otra parte, también se encontró relación entre el **quimerismo en LT** y el tratamiento recibido previamente, siendo **más precoz** para pacientes que recibieran un **TPH autólogo previo** ($p<0,01$), tratamiento con **QT previo** al TPH ($p<0,01$), y **2 o más líneas de tratamiento QT** ($p<0,01$). Sin embargo, se observó un QC más precoz en LT para los pacientes que recibían **acondicionamiento de intensidad reducida** ($p=0,01$).

Cohorte global	
Factor pretrasplante	p
Edad > 44,9 años	0,14
Receptor varón + donante mujer	0,13
Sexo donante	0,32
Sexo receptor	0,60
Fuente CPH	0,46
Fuente CPH (SP vs. SCU)	0,89
Tipo TPH	0,04
Patología de base	<0,01
Diagnóstico linfoma	<0,01
Diagnóstico leucemia	0,70
LMA vs. LLA	<0,01
Diagnóstico SMD/SMP	<0,01
Diagnóstico MM	<0,01
TPH autólogo previo	<0,01
QT previa	<0,01
Líneas de QT (<2)	<0,01
AIR vs. AMA	0,01
Profilaxis EICR DNE	0,44
CD34+ infundidas <4,77	0,40
CNT infundidas <6,76	0,70
RC pretrasplante	0,08
CMV negativo	0,73

Tabla 19.- Estudio de la IA de QC en LT en la cohorte global (n=193) según distintos factores pretrasplante.

Tipo TPH (p)	Haplo	DNE	SCU
DNE	0,01		
SCU	0,33	0,65	
DE	<0,01	0,43	0,40

Tabla 20.- Estudio de la IA de QC en LT en la cohorte global (n=193) según distintos tipos de donante.

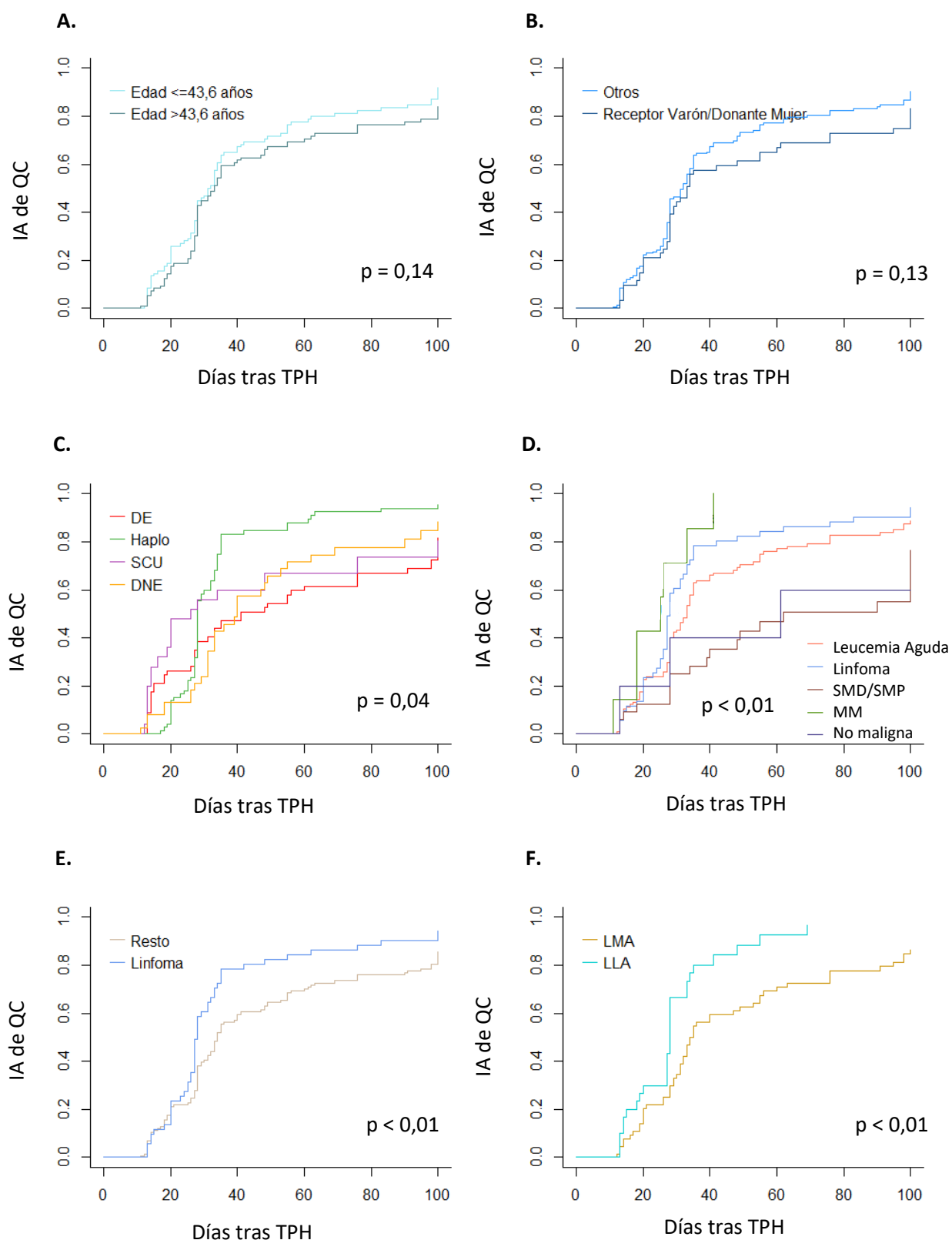


Figura 26.- IA de QC en LT en la cohorte global (n=193) según edad del receptor al TPH (A), disparidad de sexo (B), tipo de donante (C), diagnóstico (D), diagnóstico de linfoma (E), y LMA frente a LLA (F).

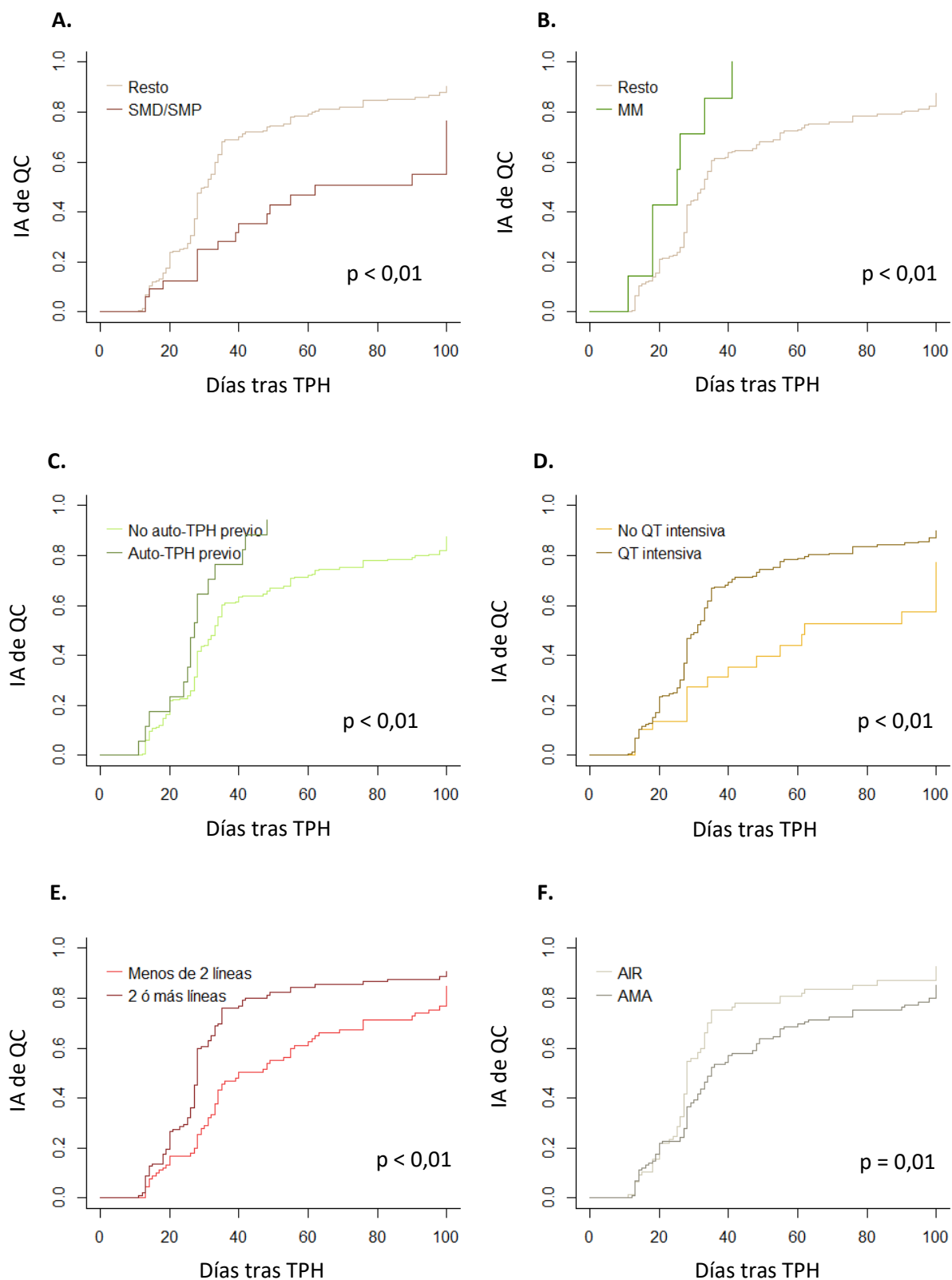


Figura 27.- IA de QC en LT en la cohorte global (n=193) según el diagnóstico de SMD/SMP (A), el diagnóstico de MM (B), haber recibido TPH autólogo previo (C), haber recibido QT intensiva previa (D), haber recibido menos de 2 líneas de QT previa (E), y la intensidad del acondicionamiento (F).

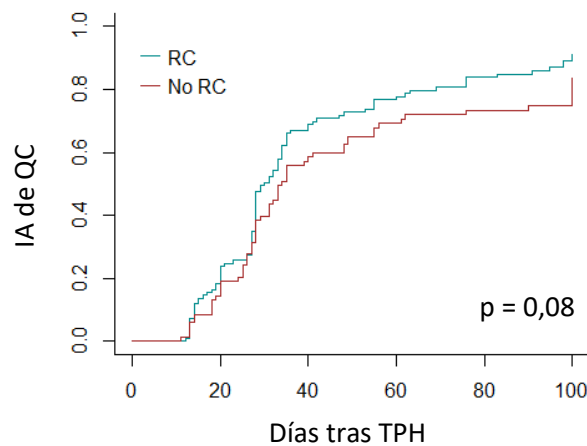


Figura 28.- IA de QC en LT en la cohorte global (n=193) según la situación de la enfermedad previo al TPH.

En el **análisis multivariable**, se mantuvo la significación estadística en el **TPH haploidéntico** frente al resto como un factor de riesgo de adquisición temprana de QC en LT (HR 1,52; $p=0,02$), y los pacientes con **diagnóstico de SMD ó SMP** como un factor protector de adquisición temprana de QC en LT frente al resto (HR 0,59; $p=0,03$).

De la misma manera, se analizaron los factores pretrasplante y su relación con la IA de QC en LT en la cohorte de pacientes con **diagnóstico de LMA**. Los pacientes con **TPH de DE mostraron un QC más tardío** en LT frente al TPH haploidéntico, de DNE y de SCU ($p<0,01$). Los pacientes con **TPH haploidéntico tuvieron un QC en LT más precoz** que aquellos con TPH de DNE ($p=0,05$) (Tablas 21 y 22, Figura 29).

Cohorte LMA	
Factor pretrasplante	p
Edad > 44,9 años	0,16
Receptor varón + donante mujer	0,16
Sexo donante	0,27
Sexo receptor	0,87
Fuente CPH (SP vs. SCU)	0,06
Tipo TPH	0,01
AIR vs. AMA	0,62
CD34+ infundidas ≤ 4,77	0,71
CNT infundidas ≤ 6,76	0,14
RC pretrasplante	0,51

Tabla 21.- Estudio de la IA de QC en LT en la cohorte de pacientes con diagnóstico de LMA (n=73) según distintos factores pretrasplante.

Tipo TPH (p)	Haplo	DNE	SCU
DNE	0,05		
SCU	0,74	0,25	
DE	<0,01	<0,01	0,01

Tabla 22.- Estudio de la IA de QC en LT en la cohorte de pacientes con diagnóstico de LMA (n=73) según distintos tipos de donante.

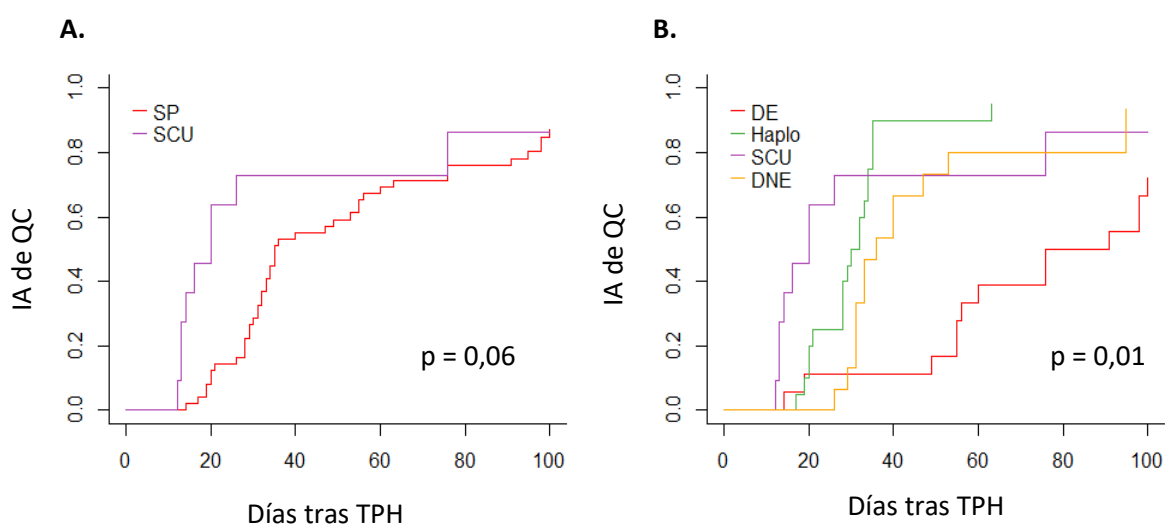


Figura 29.- IA de QC en LT en la cohorte de pacientes con diagnóstico de LMA según el tipo de donante.

c) Quimerismo en células mieloides

En cuanto a la relación de la IA de **QC en CM** y los factores pretrasplante, se observó un QC más **precoz** al emplear la **SP como fuente de CPH frente a la SCU** ($p < 0,01$), un QC más **tardío de los TPHs de SCU frente al resto de donantes** ($p < 0,01$), y un QC más **precoz** en los pacientes con **diagnóstico de MM** ($p < 0,01$) (Tablas 23 y 24, Figura 30).

Cohorte global	
Factor pretrasplante	p
Edad > 44,9 años	0,89
Receptor varón + donante mujer	0,78
Sexo donante	0,52
Sexo receptor	0,86
Fuente CPH	0,02
Fuente CPH (SP vs. SCU)	<0,01
Tipo TPH	0,02
Patología de base	<0,01
Diagnóstico linfoma	0,67
Diagnóstico leucemia	0,96
LMA vs. LLA	
Diagnóstico SMD/SMP	0,16
Diagnóstico MM	<0,01
TPH autólogo previo	0,96
QT previa	0,24
Líneas de QT (<2)	0,86
AIR vs. AMA	0,36
Profilaxis EICR DNE	0,62
CD34+ infundidas <4,77	0,41
CNT infundidas <6,76	0,10
RC pretrasplante	0,50
CMV negativo	0,30

Tabla 23.- IA de QC en CM en la cohorte global (n=193) según distintos factores pretrasplante.

Tipo TPH (p)	Haplo	DNE	DE
DNE	0,30		
DE	0,29	0,95	
SCU	<0,01	<0,01	<0,01

Tabla 24.- IA de QC en CM en la cohorte global (n=193) según distintos tipos de donante.

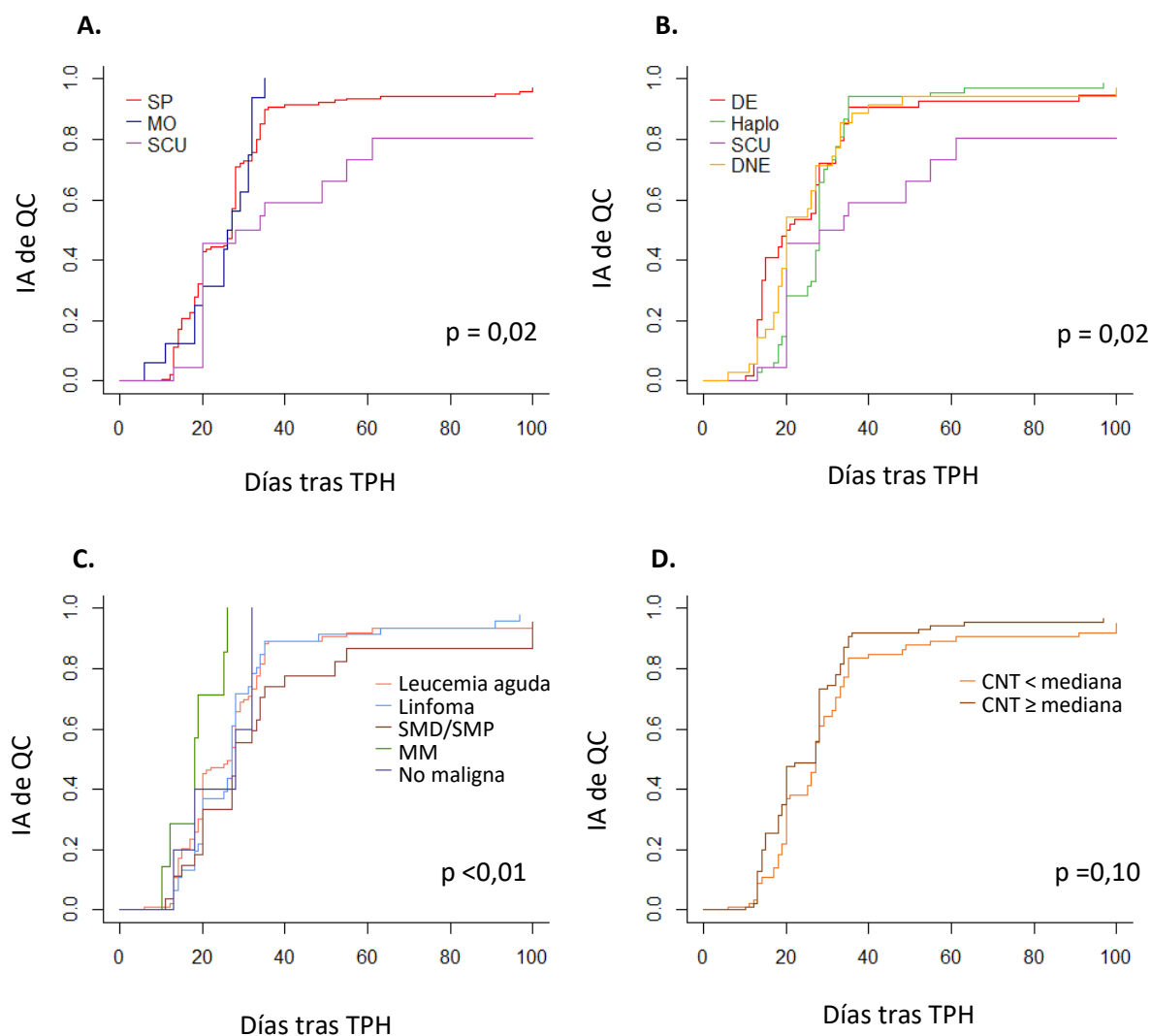


Figura 30.- IA de QC en CM según la fuente de CPH (A), el tipo de donante (B), el diagnóstico de base (C) y el número de CNT infundidas (D).

Debido a que sólo se encontró relación con el empleo del donante/fuente de PH la SCU frente al resto, no se realizó análisis multivariante de la IA de QC en CM y factores pretrasplante en la cohorte global.

La relación de los factores pretrasplante con la IA de QC en CM en el subgrupo de pacientes con diagnóstico de LMA se presenta en las Tablas 25 y 26. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en este grupo.

Cohorte LMA	
Factor pretrasplante	p
Edad > 44,9 años	0,84
Receptor varón + donante mujer	0,61
Sexo donante	0,40
Sexo receptor	0,76
Fuente CPH (SP vs. SCU)	0,27
Tipo TPH	0,68
AIR vs. AMA	0,80
CD34+ infundidas ≤ 4,77	0,43
CNT infundidas ≤ 6,76	0,50
RC pretrasplante	0,91

Tabla 25.- Estudio de la IA de QC en CM en la cohorte de pacientes con diagnóstico de LMA (n=65) según distintos factores pretrasplante.

Tipo TPH (p)	Haplo	DNE	DE
DNE	0,90		
DE	0,70	0,89	
SCU	0,19	0,25	0,41

Tabla 26.- Estudio de la IA de QC en CM en la cohorte de pacientes con diagnóstico de LMA (n=65) según distintos tipos de donante.

d) Quimerismo en médula ósea

Se encontró un **QC más precoz en MO** en pacientes con una **edad por debajo de 44,9 años** ($p<0,01$) y con **enfermedad en RC** previo al TPH ($p=0,01$), así como los que recibían **TPH haploideéntico frente a DE** ($p=0,03$). Los pacientes con diagnóstico de **SMD/SMP** presentaron una **adquisición más tardía** de QC en MO ($p=0,02$). Los resultados se presentan en las Tablas 27 y 28 y en la Figura 31.

Cohorte global	
Factor pretrasplante	p
Edad receptor > 44,9 años	<0,01
Edad donante > 41 años	0,29
Receptor varón + donante mujer	0,48
Sexo donante	0,99
Sexo receptor	0,60
Fuente CPH	0,71
Fuente CPH (SP vs. SCU)	0,41
Tipo TPH	0,08
Patología de base	0,24
Diagnóstico linfoma	0,50
Diagnóstico leucemia	0,22
LMA vs. LLA	0,80
Diagnóstico SMD/SMP	0,02
Diagnóstico MM	0,44
TPH autólogo previo	0,99
QT previa	0,13
Líneas de QT (<2)	0,12
AIR vs. AMA	0,43
Profilaxis EICR DNE	0,89
CD34+ infundidas <4,77	0,84
CNT infundidas <6,76	0,40
RC pretrasplante	0,01
CMV negativo	0,30

Tabla 27.- IA de QC en MO en la cohorte global (n=193) según distintos factores pretrasplante.

Tipo TPH (p)	Haplo	DNE	DE
DNE	0,08		
DE	0,03	0,82	
SCU	0,10	0,76	0,96

Tabla 28.- IA de QC en MO en la cohorte global (n=193) según distintos tipos de donante.

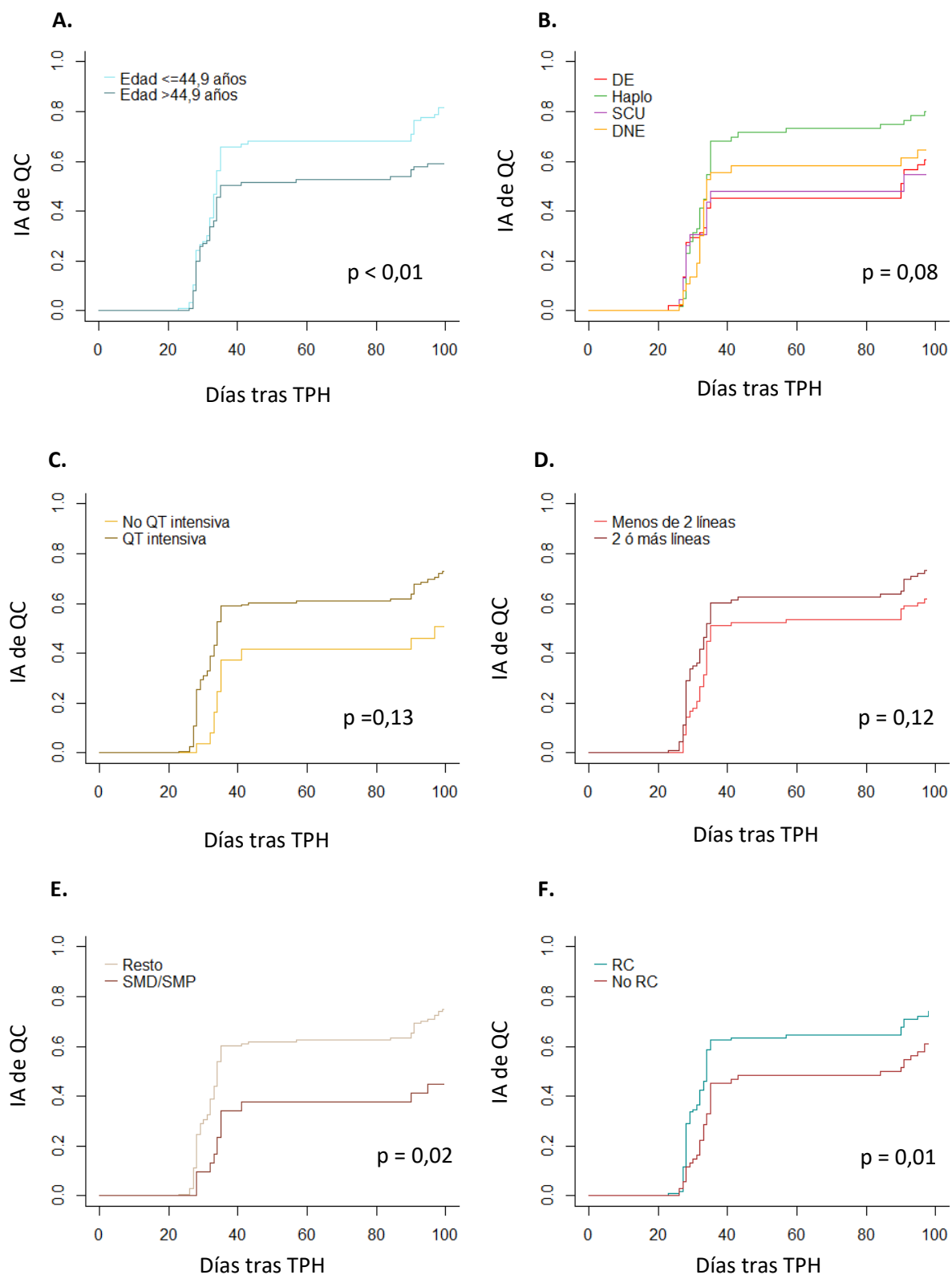


Figura 31.- IA de QC en MO en la cohorte global (n=193) según la edad (A), el tipo de donante (B), el haber recibido QT intensiva (C), el haber recibido 2 ó más líneas de QT intensiva (D), el diagnóstico de SMD/SMP (E), y la situación de la enfermedad antes del TPH (F).

Debido al hallazgo de la influencia de la edad del receptor en la IA de QC en MO, se estudió la correlación entre la edad del donante y del receptor, encontrando una correlación clara sólo en el subgrupo de TPH de DE (correlación de Pearson 0,85; $p < 0,01$). Sin embargo, en este subgrupo de pacientes no se encontró relación significativa entre la edad del donante y la adquisición de QC, si bien sí que parecía existir una tendencia a un QC más precoz para los donantes más jóvenes ($p = 0,13$). Por otra parte, se encontraron diferencias en la mediana de edad por diagnóstico (siendo 43 años para leucemia aguda, 42,6 para linfoma, y 54,7 para SMD/SMP).

En el **análisis multivariable**, se encontró correlación de la edad del receptor por encima de 44,9 años con la presencia de QC en MO más tardío (HR 0,63; $p < 0,01$) y el TPH haploidéntico con la presencia de un QC en MO más precoz (HR 1,45; $p = 0,03$).

También se analizaron la adquisición del quimerismo en MO y las variables pretrasplante en la cohorte de **pacientes con diagnóstico de LMA**. Al igual que en la cohorte global, los pacientes con **RC pretrasplante** presentaron un QC más precoz en MO. Los resultados se resumen en las Tablas 29 y 30.

Cohorte LMA	
Factor pretrasplante	p
Edad > 44,9 años	0,10
Receptor varón + donante mujer	0,16
Sexo donante	0,56
Sexo receptor	0,54
Fuente CPH (SP vs. SCU)	0,24
Tipo TPH	0,23
AIR vs. AMA	0,18
CD34+ infundidas $\leq 4,77$	0,75
CNT infundidas $\leq 6,76$	0,86
RC pretrasplante	0,01

Tabla 29.- IA de QC en MO en la cohorte de pacientes con diagnóstico de LMA (n=65) según distintos factores pretrasplante.

Tipo TPH (p)	Haplo	DNE	DE
DNE	0,34		
DE	0,07	0,51	
SCU	0,71	0,38	0,13

Tabla 30.- IA de QC en MO en la cohorte de pacientes con diagnóstico de LMA (n=65) según distintos tipos de donante.

e) Quimerismo en células CD34+

Se encontró un **QC más precoz en CD34+ en los TPH de SCU frente a DE y DNE** ($p=0,04$) y en los **TPH haploidénticos frente a DE** ($p=0,04$). También se encontró una adquisición más precoz de QC en pacientes que presentaban **RC pretrasplante** frente a pacientes con enfermedad visible ($p<0,01$). Los resultados se presentan en las Tablas 31 y 32 y en la Figura 32.

Cohorte global	
Factor pretrasplante	p
Edad > 44,9 años	0,50
Receptor varón + donante mujer	0,26
Sexo donante	0,45
Sexo receptor	0,40
Fuente CPH	0,11
Fuente CPH (SP vs. SCU)	0,04
Tipo TPH	0,03
LMA vs. LLA	0,97
Diagnóstico SMD/SMP	0,05
Líneas de QT (<2)	0,18
AIR vs. AMA	0,73
CD34+ infundidas <4,77	0,70
CNT infundidas <6,76	0,70
RC pretrasplante	<0,01

Tabla 31.- IA de QC en CD34+ en la cohorte global (n=193) según distintos factores pretrasplante.

Tipo TPH (p)	Haplo	DNE	DE
DNE	0,12		
DE	0,04	0,54	
SCU	0,52	0,04	0,04

Tabla 32.- IA de QC en CD34+ en la cohorte global (n=193) según distintos tipos de donante.

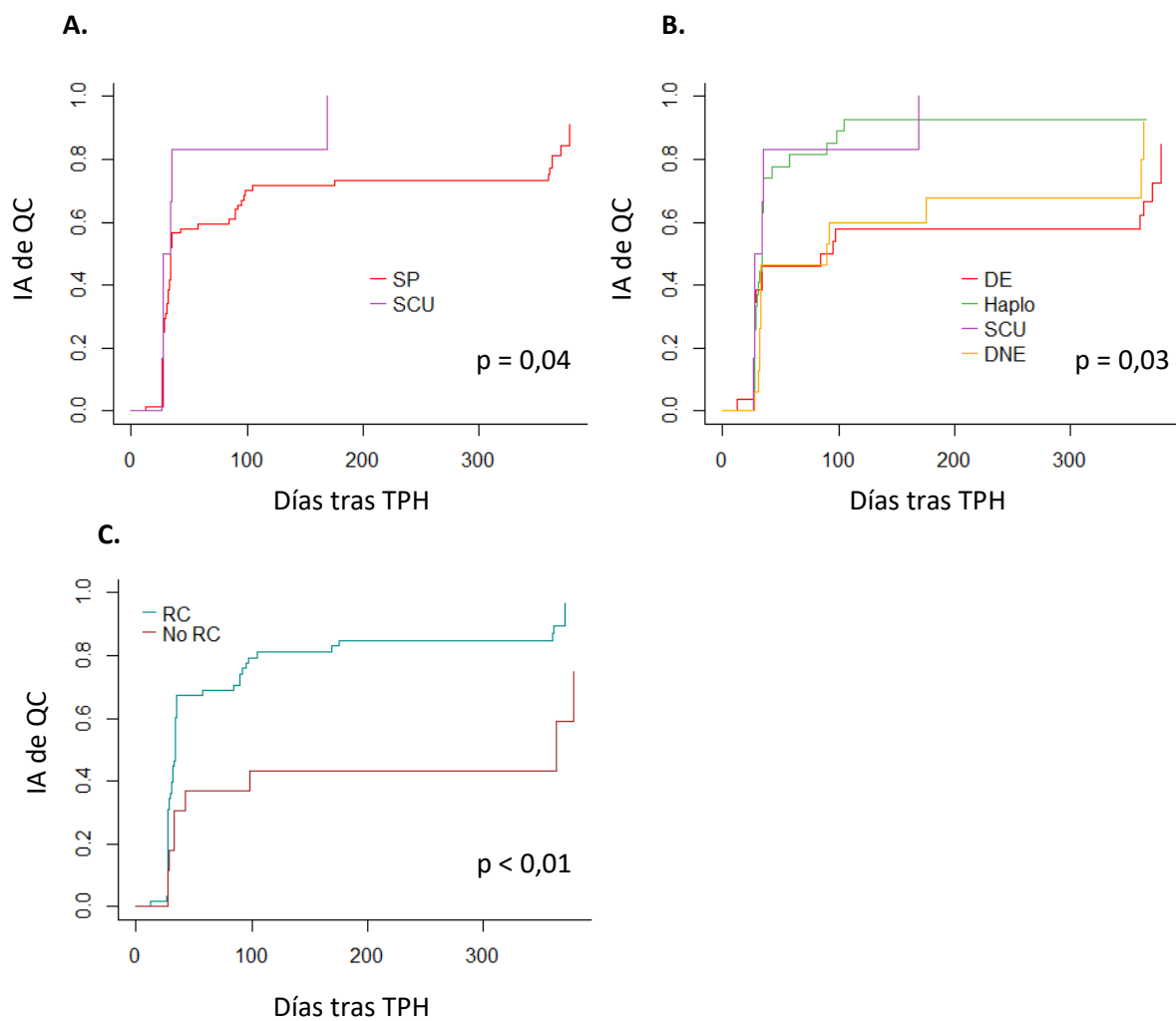


Figura 32.- IA de QC en CD34+ en la cohorte global (n=193) según la fuente de PH (A), el tipo de TPH (B) y el estado de la enfermedad pretrasplante (C).

En el **análisis multivariable** se encontró que los pacientes que no estaban en RC previo al TPH, presentaban una IA de QC en CD34+ más tardía (HR 0,43; $p=0,02$).

3.- Quimerismo y complicaciones postrasplante

a) Estudio descriptivo de los resultados del trasplante

Se analizó la IA de EICRa grado II-IV y III-IV, de EICRc global y moderada-severa, de recaída, de *exitus* y de MRT global y precoz y se compararon los resultados en la cohorte global, de pacientes con diagnóstico de LMA y por tipo de donante. Los resultados se resumen en la Tabla 33. A continuación se desglosan las comparaciones entre los distintos subgrupos.

IA	Cohorte global	LMA	DE	DNE	SCU	Haplo
N	193	65	57	39	25	72
EICRa global – IA día +150						
○ Grado II-IV	31 %	31 %	39 %	34 %	16 %	28 %
○ Grado III-IV	11%	8 %	14 %	8 %	12 %	11 %
EICRc global – IA	35 %	31 %	49 %	41 %	8 %	31 %
○ Moderada-severa	22 %	20 %	37 %	23 %	0 %	18 %
Recaída – IA	33 %	33 %	35 %	29 %	39 %	32 %
ILD – n (%)	18 (9 %)	7 (11 %)	7 (12 %)	3 (8 %)	0	8 (11 %)
<i>Exitus</i> – IA	60 %	48 %	53 %	63 %	66 %	56 %
○ MRT	31 %	20 %	28 %	40 %	41 %	25 %
○ MRT +150	16 %	8 %	16 %	13 %	41 %	8 %
SG						
○ 3 años	51 %	52 %	54 %	51 %	39 %	52 %
○ 5 años	49 %	52 %	50 %	51 %	39 %	50 %
Seguimiento vivos (años) – mediana (rango)	5,05 (1,01-8,50)	4,75 (1,01-8,28)	5,81 (1,45-8,28)	5,01 (2,99-8,50)	6,17 (1,01-7,30)	4,20 (2,38-8,04)

Tabla 33.- IA de complicaciones en las distintas cohortes: global, de pacientes con diagnóstico de LMA y de pacientes con TPH de DE, DNE, SCU y haploidentico.

Cabe destacar la baja IA de EICRa y EICRc en el subgrupo de pacientes con TPH de DNE. Ésta puede ser en parte explicada por el empleo de profilaxis de EICR con ciclofosfamida postrasplante en un tercio de los pacientes, con una IA de EICRa global en este subgrupo de 9 %, de EICRc global de 17 % y de EICRc moderada-severa de 0 %. El seguimiento en esta cohorte de pacientes es, además, más corto, debido al inicio del empleo de este tipo de profilaxis en el año 2014. Los resultados se presentan en la Tabla 34.

IA	DNE	DNE-ATG	DNE-Cy
N	39	27	12
EICRa global – IA día +150			
○ Grado II-IV	34 %	44 %	9 %
○ Grado III-IV	8 %	11 %	0 %
EICRc global – IA	41 %	52 %	17 %
○ Moderada-severa	23 %	33 %	0 %
Recaída – IA	29 %	32 %	18 %
ILD – n (%)	3 (8 %)	3 (11 %)	0
Exitus – IA	63 %	68 %	33 %
○ MRT	40 %	46 %	18 %
○ MRT +150	13 %	15 %	8 %
SG			
○ 3 años	51 %	44 %	67 %
○ 5 años	51 %	44 %	-
Seguimiento (años) – mediana (rango)	5,01 (2,99-8,50)	7,08 (4,51-8,50)	3,44 (2,99-4,03)

Tabla 34.- IA de complicaciones en los pacientes con TPH de DNE según la profilaxis de EICR recibida.

b) Quimerismo y fracaso del injerto

En la serie analizada hubo 5 fracasos primarios y 3 fracasos secundarios de injerto. De los pacientes con fracaso primario del injerto, 4/5 presentaron un porcentaje de células del donante inferior a 80 % en SP a día +15 y a día +30 e inferior a 40 % en LT a día +21. Un paciente presentó un 87 % de células del donante en MO a día +30, el resto inferior al 5 %. Todos los pacientes con fracaso secundario del injerto presentaron una dinámica descendente en cuanto al porcentaje de células del donante, con un porcentaje de células del donante inferior al 80 % en SP e inferior al 40 % en LT en el momento del diagnóstico de fracaso de injerto. Se presentan dos gráficas con la dinámica del quimerismo en los pacientes con fracaso de injerto en las Figuras 33 y 34.

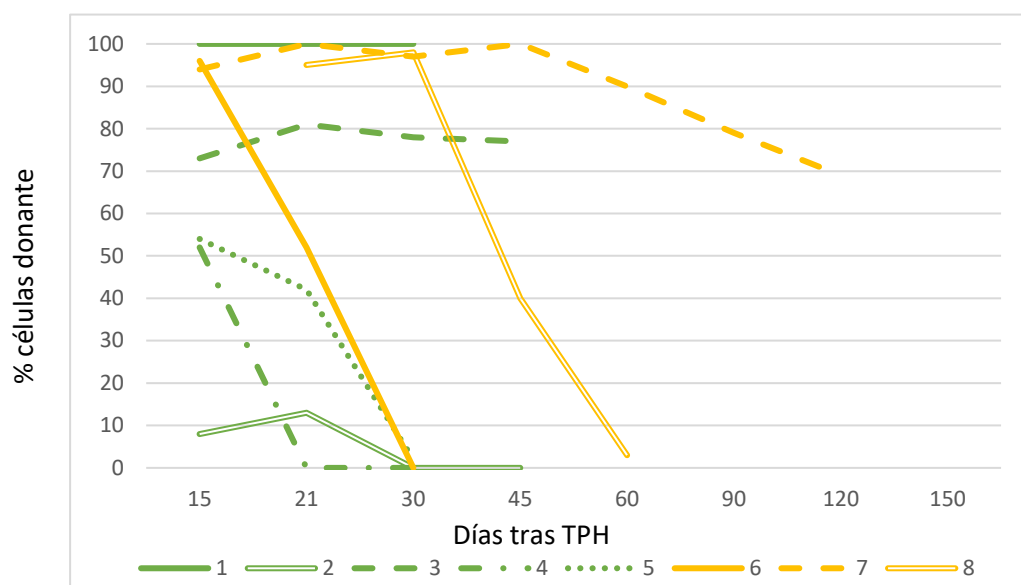


Figura 33.- Dinámica del quimerismo en SP en los pacientes con fracaso del injerto. Verde: fracaso primario; Amarillo: fracaso secundario.

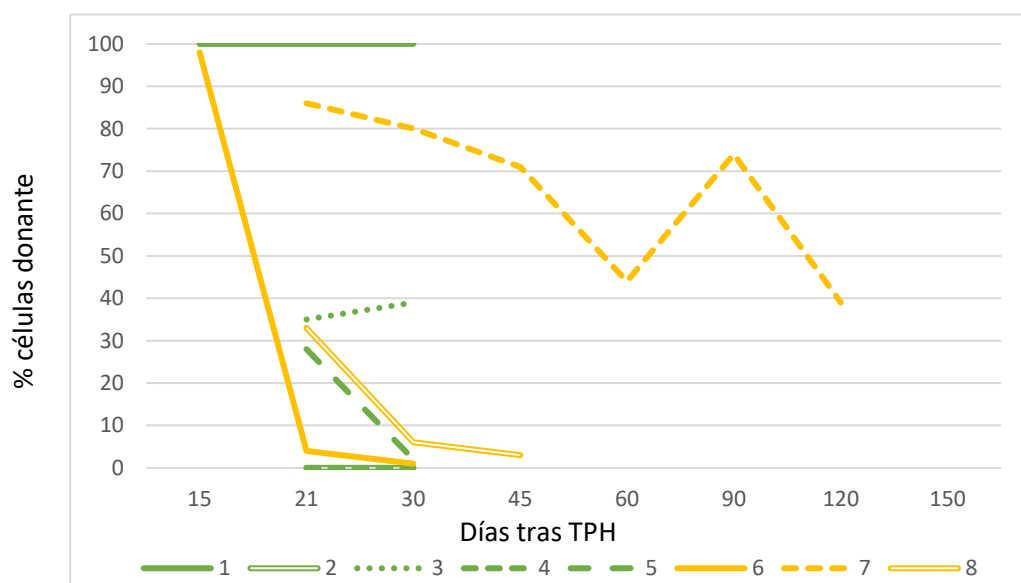


Figura 34.- Dinámica del quimerismo en LT en los pacientes con fracaso del injerto. Verde: fracaso primario; Amarillo: fracaso secundario

c) EICR

i. EICR aguda

Previo al análisis de IA de EICR según el estatus del quimerismo, se estudiaron factores pretrasplante que podían influir en la EICRa.

Cohorte global		
Factor pretrasplante	p (EICRa II-IV)	p (EICRa III-IV)
Edad > 44,9 años	0,71	0,35
Receptor varón + donante mujer	0,56	0,94
Sexo donante	0,40	0,61
Sexo receptor	0,43	0,40
Fuente CPH	0,10	0,98
Fuente CPH (SP vs. SCU)	0,06	0,90
Tipo TPH	0,14	0,83
Patología de base	0,13	0,11
Diagnóstico leucemia	0,61	0,15
Diagnóstico linfoma	0,34	0,70
Diagnóstico SMD/SMP	0,03	<0,01
Diagnóstico MM	0,49	0,81
Diagnóstico patología no maligna	0,14	0,42
TPH autólogo previo	0,51	0,97
QT previa	0,08	0,02
Líneas de QT < 2	0,06	0,22
AIR vs. AMA	0,54	0,69
Profilaxis EICR DNE	0,03	0,24
CD34+ infundidas ≤ 4,77	0,42	0,17
CNT infundidas ≤ 6,76	0,04	0,98
RC pretrasplante	0,47	<0,01
CMV negativo	0,26	0,14

Tabla 35.- Relación entre distintos factores pretrasplante e IA de EICRa.

Se encontró que los pacientes con **diagnóstico de SMD/SMP** presentaban mayor IA de EICRa grados II-IV y III-IV ($p=0,03$ y $p<0,01$), aquellos con **mayor número de CNT infundidas** presentaron mayor IA de EICRa grados II-IV ($p=0,04$), y los pacientes con **QT intensiva previa y en situación distinta de RC pretrasplante** presentaban mayor IA de EICRa grados III-IV ($p=0,02$ y $p<0,01$). Al comparar los pacientes con TPH de DNE según la profilaxis de EICR empleada, se encontró una IA de EICRa grados

II-IV significativamente menor en los que recibieron **ciclofosfamida postrasplante** ($p=0,03$), sin que se observaran diferencias en la EICRa grave, en probable relación con el escaso número de casos. Los resultados se resumen en las Tablas 35-37 y en las Figuras 35 y 36.

En la comparación de la IA de EICRa grados II-IV por tipo de TPH (Tabla 36, Figura 35), se encontró una mayor incidencia en los pacientes con **TPH de DE frente a TPH de SCU**. No se encontraron diferencias en la IA de EICRa grados III-IV (Tabla 37, Figura 35).

Tipo TPH (p)	DE	Haplo	DNE
Haplo	0,14		
DNE	0,87	0,30	
SCU	0,04	0,25	0,09

Tabla 36.- IA de EICRa grados II-IV por tipo de donante.

Tipo TPH (p)	DE	Haplo	DNE
Haplo	0,60		
DNE	0,37	0,59	
SCU	0,80	0,90	0,59

Tabla 37.- IA de EICRa grados III-IV por tipo de donante.

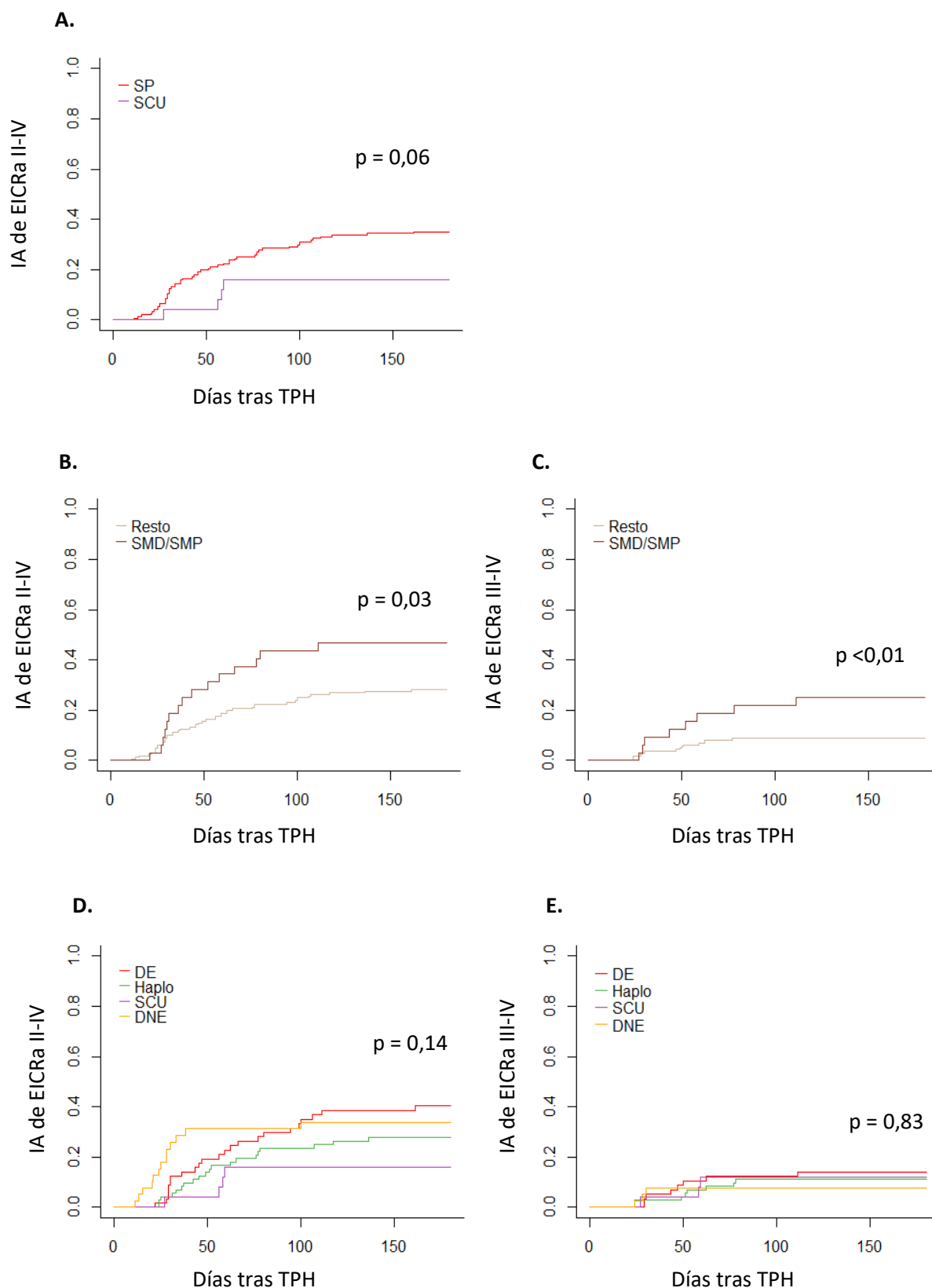


Figura 35.- IA de EICRa según distintos factores pretrasplante: fuente de PH SP frente a SCU (A), diagnóstico de SMD/SMP (B y C), y tipo de donante (D y E).

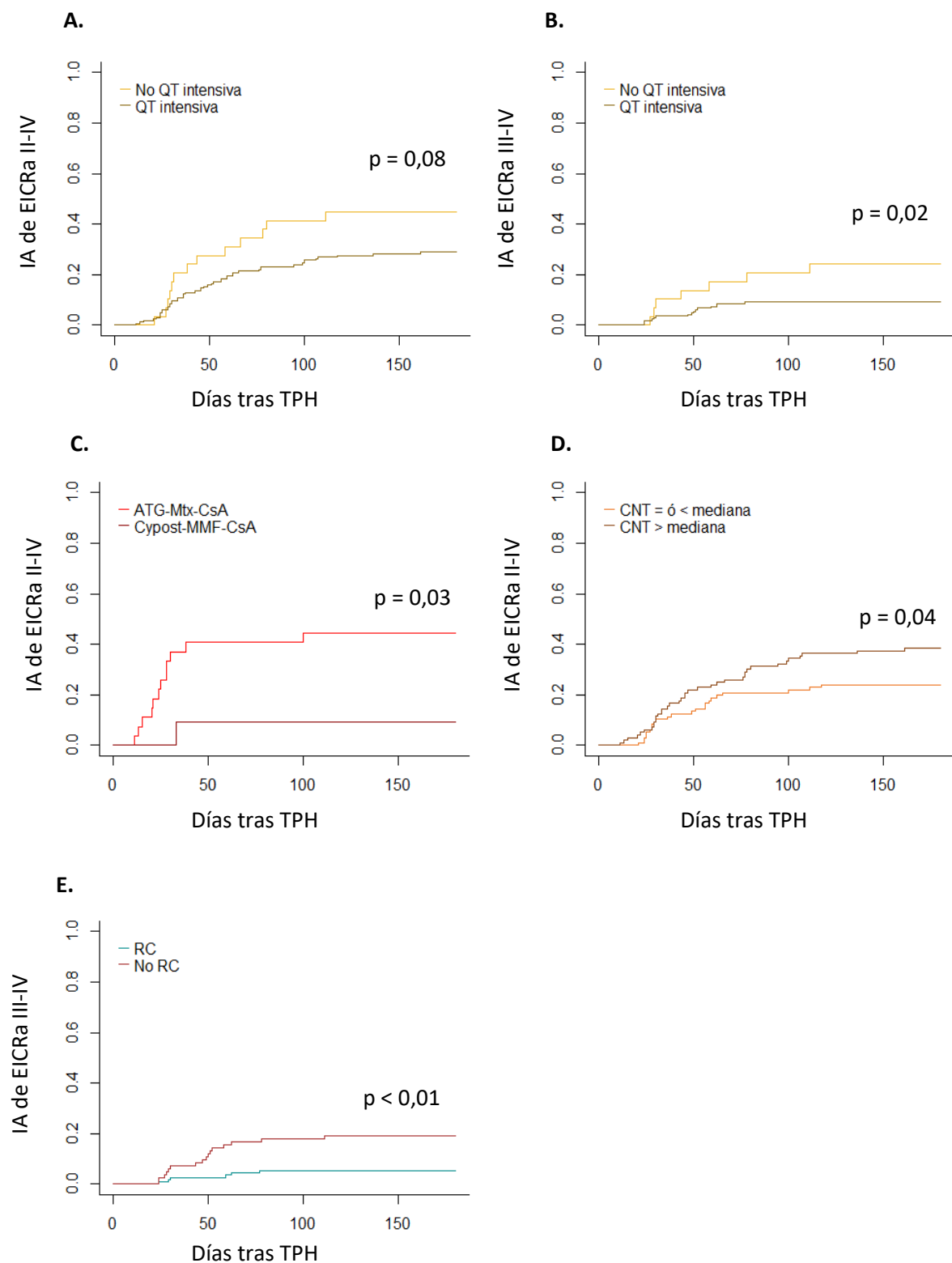


Figura 36.- IA de EICRa según distintos factores pretrasplante: haber recibido QT intensiva pretrasplante (A y B), profilaxis de EICR en TPH de DNE (C), CNT infundidas (D) y estatus de la enfermedad al TPH (E).

Se analizó la relación del estatus del quimerismo en distintos linajes y distintos puntos del TPH con la IA de EICRa. Se estudió el estatus del quimerismo (QC ó QM) en SP entre los días +15 y +21 (1) y a día +30 (2); en LT (3) y en CM (4) entre los días +21 y +30; y en MO a día +30 (5). A continuación, se presentan los resultados en la cohorte global, en la cohorte de pacientes con diagnóstico de LMA, y desglosados por tipo de donante.

Quimerismo y EICR aguda grados II-IV

Se encontró que los pacientes que recibían un **TPH de DNE y alcanzaron QC en SP y LT** de forma más temprana (días 15-30), presentaban una mayor IA de EICRa grados II-IV. Por el contrario, los pacientes que recibían un **TPH haploidéntico y además estaban en QM en MO a día +30** presentaban una mayor IA de EICRa grados II-IV. No se encontraron otras diferencias estadísticamente significativas, si bien se representan gráficamente todos los análisis con una $p < 0,1$ a modo informativo. Los resultados se presentan en la Tabla 38 y en la Figura 37. En las figuras, el número de pacientes que aparece sobre cada rama se refiere al número de pacientes en QC/QM en riesgo de desarrollar EICR.

	Cohorte global	LMA	DE	DNE	Haplo	SCU
Linaje/día	p	p	p	p	p	p
SP+15+21	0,89	0,98	0,08	0,01	0,16	1,00
SP+30	0,41	0,56	0,25	0,12	0,22	0,40
LT+30	0,94	0,98	0,29	0,03	0,87	0,49
CM+30	0,74	0,20	0,41	-	0,06	0,46
MO+30	0,43	0,26	0,76	0,09	<0,01	0,47

Tabla 38.- Comparación de la IA de EICRa II-IV en la cohorte global, de pacientes con diagnóstico de LMA, y según el tipo de donante, según el estatus de quimerismo en distintos compartimentos celulares.

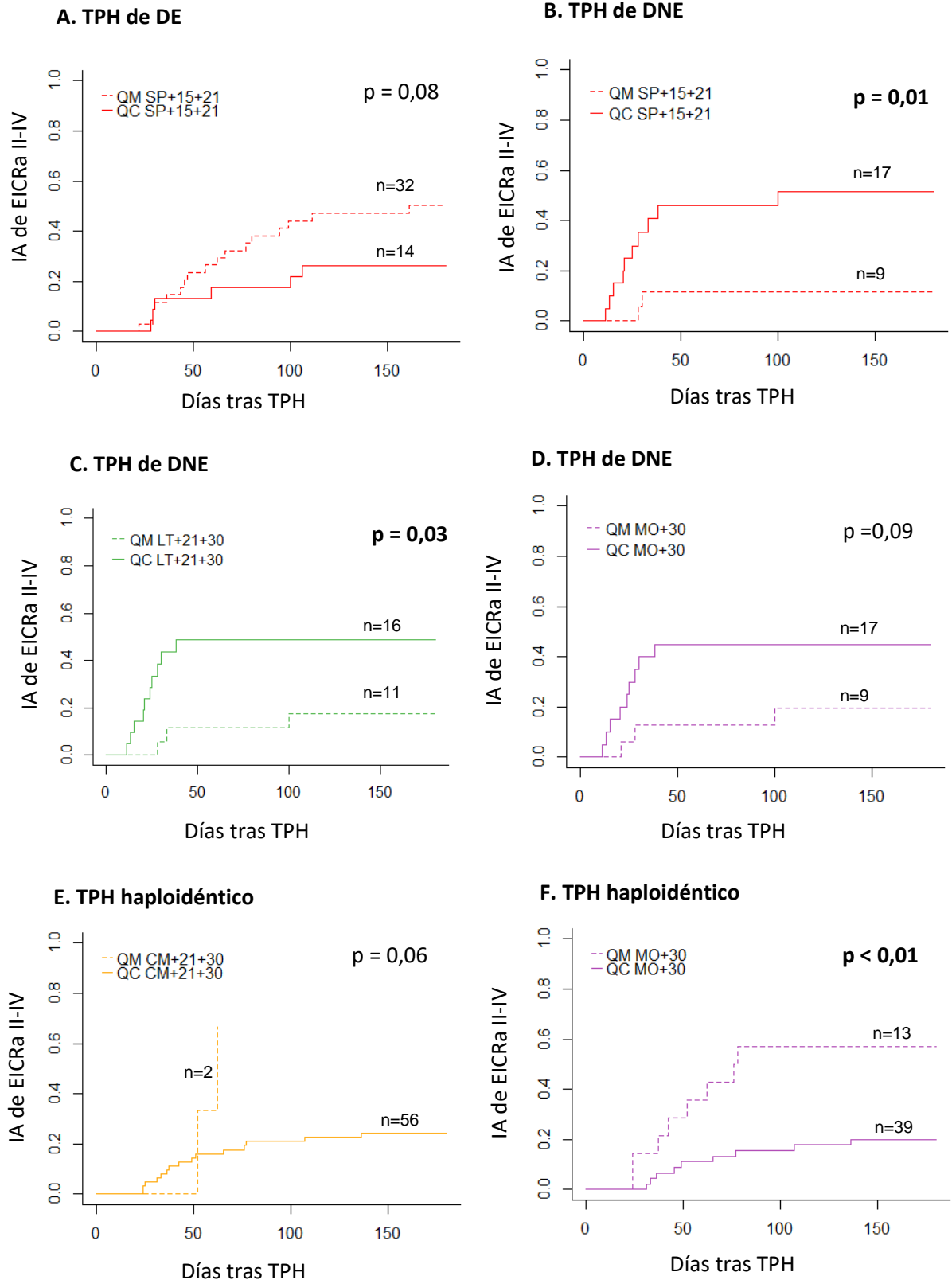


Figura 37.- IA de EICRa II-IV en TPH de DE según el estatus de quimerismo en SP a día +15+21 (A), en TPH de DNE según el estatus de quimerismo en SP a día +15+21 (B), en LT a día +21+30 (C), en MO a día +30 (D), y en TPH haploidéntico según el estatus de quimerismo en CM a día +21+30 (E) y en MO a día +30 (F).

Quimerismo y EICR aguda grados III-IV

Se encontró que, en la **cohorte global** de pacientes, aquellos que estaban en **QM a día +30 en la SP y en MO presentaban una mayor incidencia de EICRa grados III-IV**. Estos resultados se reproducían en la cohorte de pacientes con **TPH de DE y haploidéntico**, pero no en aquellos con diagnóstico de LMA o con TPH de DNE o de SCU. Los resultados se presentan en la Tabla 39 y en las Figuras 38-40.

	Cohorte global	LMA	DE	DNE	Haplo	SCU
Linaje/día	p	p	p	p	p	p
SP+15+21	0,18	0,38	0,37	0,92	0,30	0,53
SP+30	<0,01	0,08	0,01	0,36	<0,01	0,68
LT+30	0,35	0,41	0,44	0,11	0,19	0,79
CM+21+30	0,05	0,55	0,05	-	<0,01	0,75
MO+30	<0,01	0,28	0,05	0,11	<0,01	0,11

Tabla 39.- Comparación de la IA de EICRa III-IV en la cohorte global, de pacientes con diagnóstico de LMA, y según el tipo de donante, según el estatus de quimerismo en distintos compartimentos celulares.

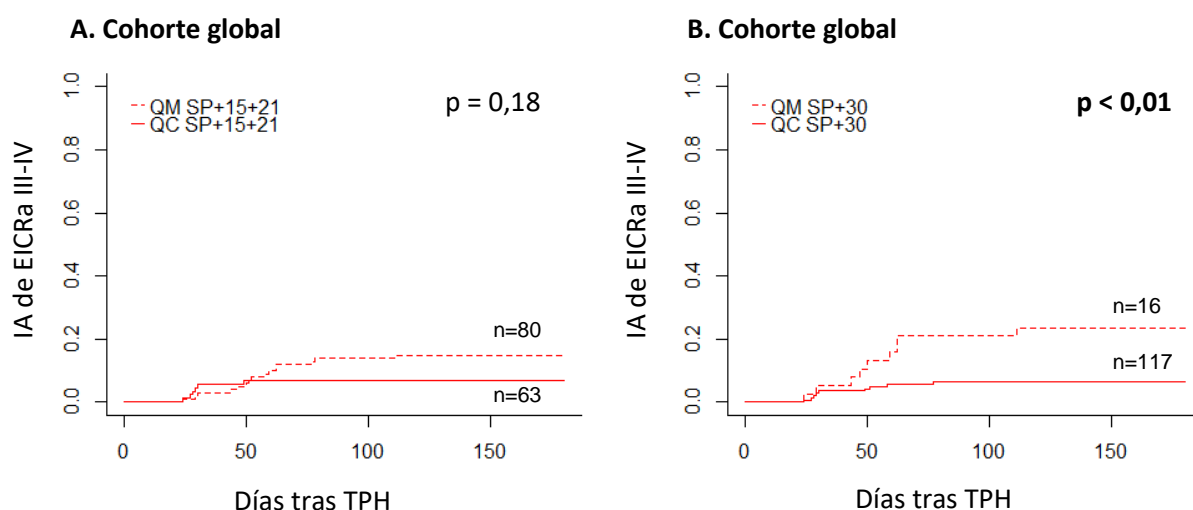


Figura 38.- IA de EICRa III-IV en la cohorte global según el estatus de quimerismo en SP a día +15+21 (A) y en SP a día +30 (B).

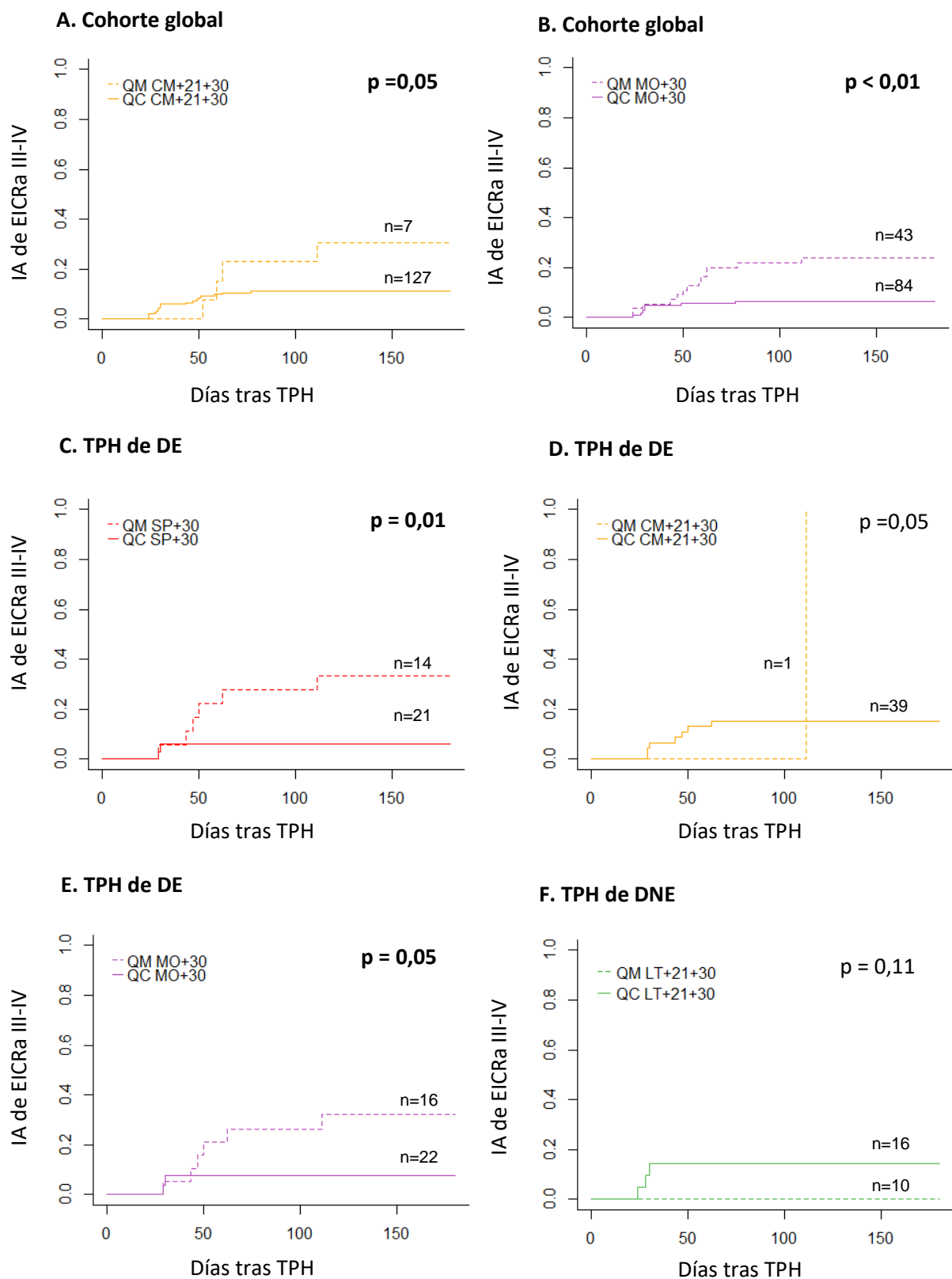


Figura 39.- IA de EICRa III-IV en la cohorte global según el estatus de quimerismo en CM a día +21+30 (A) y en MO a día +30 (B), en TPH de DE según el estatus de quimerismo en SP a día +30 (C), en CM a día +21+30 (D) y en MO a día +30 (E), y en TPH de DNE según el estatus de quimerismo en LT a día +21+30 (F).

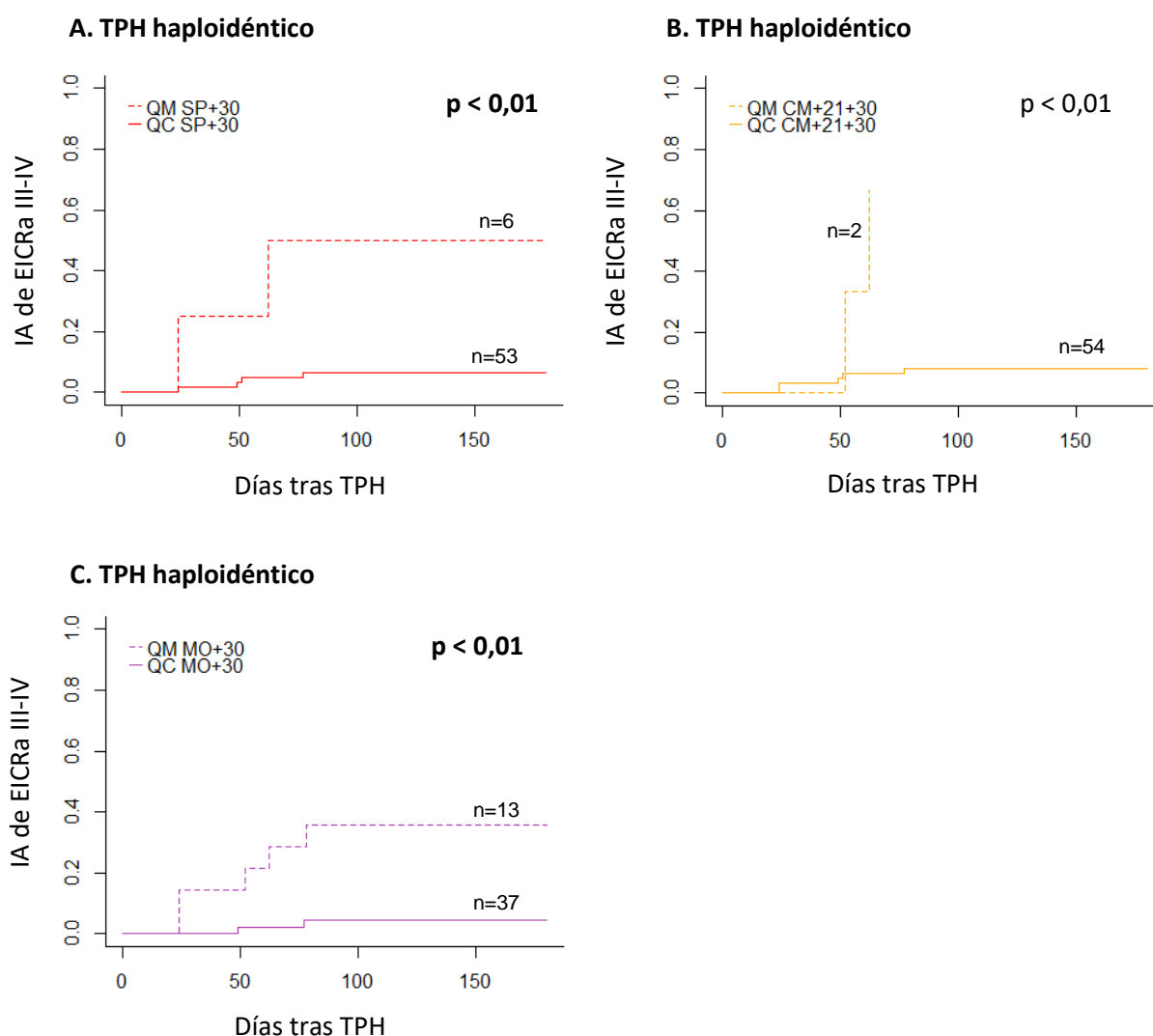


Figura 40.- IA de EICRa III-IV en TPH haploidéntico según el estatus de quimerismo en SP a día +30 (A), en CM a día +21+30 (B), y en MO a día +30 (C).

Debido a la alta IA de EICR en pacientes con QM en algunos subgrupos, se revisó la evolución de los pacientes en QM en SP y MO a día +30 incluyendo las modificaciones en la inmunosupresión. Es de especial interés que, de los pacientes en QM, 9/26 pacientes (34 %) que desarrollaron EICRa grados II-IV y 6/13 pacientes (46 %) que desarrollaron EICRa grados III-IV habían descendido la inmunosupresión en los días previos de forma precoz por indicación clínica (persistencia de QM con enfermedad de alto riesgo). También resulta de interés que los 5 pacientes con fracaso primario y 3 con fracaso secundario de la serie se encuentran dentro de este grupo. Los resultados se presentan en la Tabla 40 y la Figura 41.

Característica	Número	Característica	Número
N	70	Celularidad infundida – mediana (rango)	
Sexo varón – n (%)	46 (66)	○ CD34 (x10 ⁶ /kg)	4,38 (0,04-11,4)
Edad (años) – mediana (rango)	45 (16-68)	○ CNT/kg (x10 ⁸ /kg)	6,15 (0,1-27,8)
Diagnóstico – n (%)		Tipo donante – n (%)	
○ Leucemia Aguda	35 (50)	○ DE	25 (36)
○ LMA		○ DNE	17 (24)
○ LLA		○ SCU	12 (17)
○ Linfoma/LLC	11 (16)	○ Haplo	16 (24)
○ LH		QC – n (%)	26 (38)
○ LNH		○ SP+30	22 (32)
○ SMD-SMP	20 (28)	○ LT+21+30	52 (80)
○ Otros	4 (6)	○ CM+21+30	5 (8)
		○ MO+30	
Líneas de QT previas – n (%)		Fracaso injerto – n (%)	
○ 0	17 (24)	○ Primario	5 (7)
○ 1	29 (41)	○ Secundario	3 (4)
○ ≥2	27 (39)		
Acondicionamiento – n (%)		EICRa – n(%)	
○ AIR	21 (30)	○ II-IV	26 (37)
○ AMA	49 (70)	○ III-IV	13 (19)
TPH autólogo previo – n (%)	5 (7)	Recaída	21 (39)
Enfermedad visible al TPH – n (%)	35 (50)	Exitus	46 (65)
		○ Recaída/progresión	24 (52)
		○ Relacionada con TPH	19 (41)
		○ Otras	3 (6)
Edad donante (años) – mediana (rango)	40 (17-63)		

Tabla 40.- Características y evolución de los pacientes en QM en SP o en MO a día +30.

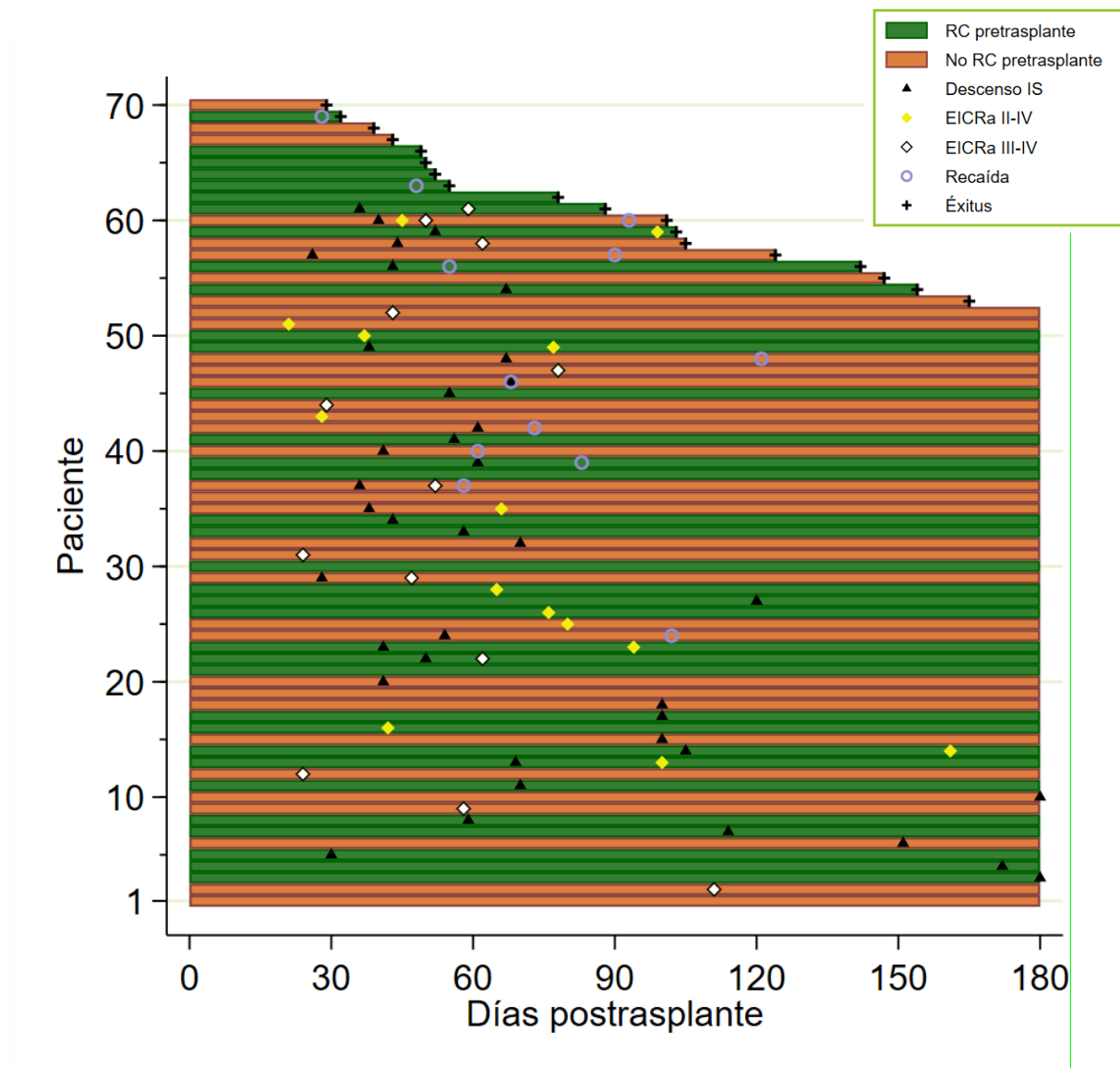


Figura 41.- Inmunomodulación y complicaciones en los pacientes en QM en SP ó en MO a día +30 (n=70).

ii. EICR crónica

Se analizaron los factores clínicos con posible influencia en el desarrollo de EICRc. Se encontró que los pacientes con **TPH de SP frente a SCU**, con TPH de DNE empleando **ATG+MTX como profilaxis**, y con **diagnóstico previo de EICRa** presentaron una mayor IA de EICRc y de EICRc moderada-severa. Los pacientes que recibieron **mayor dosis de CD34+/kg**, presentaron una mayor IA de EICRc. Los pacientes con **edad por debajo de la mediana**, y que habían recibido un **TPH autólogo previo** presentaron una mayor IA de EICRc moderada-severa. Los resultados se muestran en la Tabla 41 y en las Figuras 42-44.

Cohorte global		
Factor pretrasplante	p (EICRc)	p (EICRc mod-sev)
Edad > 44,9 años	0,06	0,03
Receptor varón + donante mujer	0,47	0,74
Sexo donante	0,88	0,68
Sexo receptor	0,66	0,37
Fuente CPH	0,02	0,02
Fuente CPH (SP vs. SCU)	<0,01	<0,01
Tipo TPH	<0,01	<0,01
Patología de base	0,70	0,37
Diagnóstico leucemia	0,43	0,67
Diagnóstico linfoma	0,90	0,09
Diagnóstico SMD/SMP	0,23	0,36
Diagnóstico MM	0,81	0,23
Diagnóstico patología no maligna	0,42	0,83
TPH autólogo previo	0,07	0,04
QT previa	0,64	0,75
Líneas de QT < 2	0,83	0,40
AIR vs. AMA	0,64	0,22
Profilaxis EICR DNE	0,04	0,03
CD34+ infundidas ≤ 4,77	0,05	0,11
CNT infundidas ≤ 6,76	0,36	0,60
RC pretrasplante	0,27	0,83
CMV negativo	0,40	0,10
EICRa II-IV	0,28	0,02

Tabla 41.- Relación entre distintos factores e IA de EICRc.

Al comparar la IA de EICRc por tipo de TPH, se encontró una IA de EICRc global y de EICR moderada-severa **menor para el TPH de SCU que para el resto, y mayor para el TPH de DE frente al haploidéntico** (Tablas 42 y 43, Figura 42).

Tipo TPH (p)	DE	DNE	Haplo
DNE	0,50		
Haplo	0,04	0,28	
SCU	<0,01	<0,01	0,03

Tabla 42.- IA de EICRc por tipo de donante.

Tipo TPH (p)	DE	DNE	Haplo
DNE	0,18		
Haplo	0,02	0,51	
SCU	<0,01	0,01	0,03

Tabla 43.- IA de EICRc moderada-severa por tipo de donante.

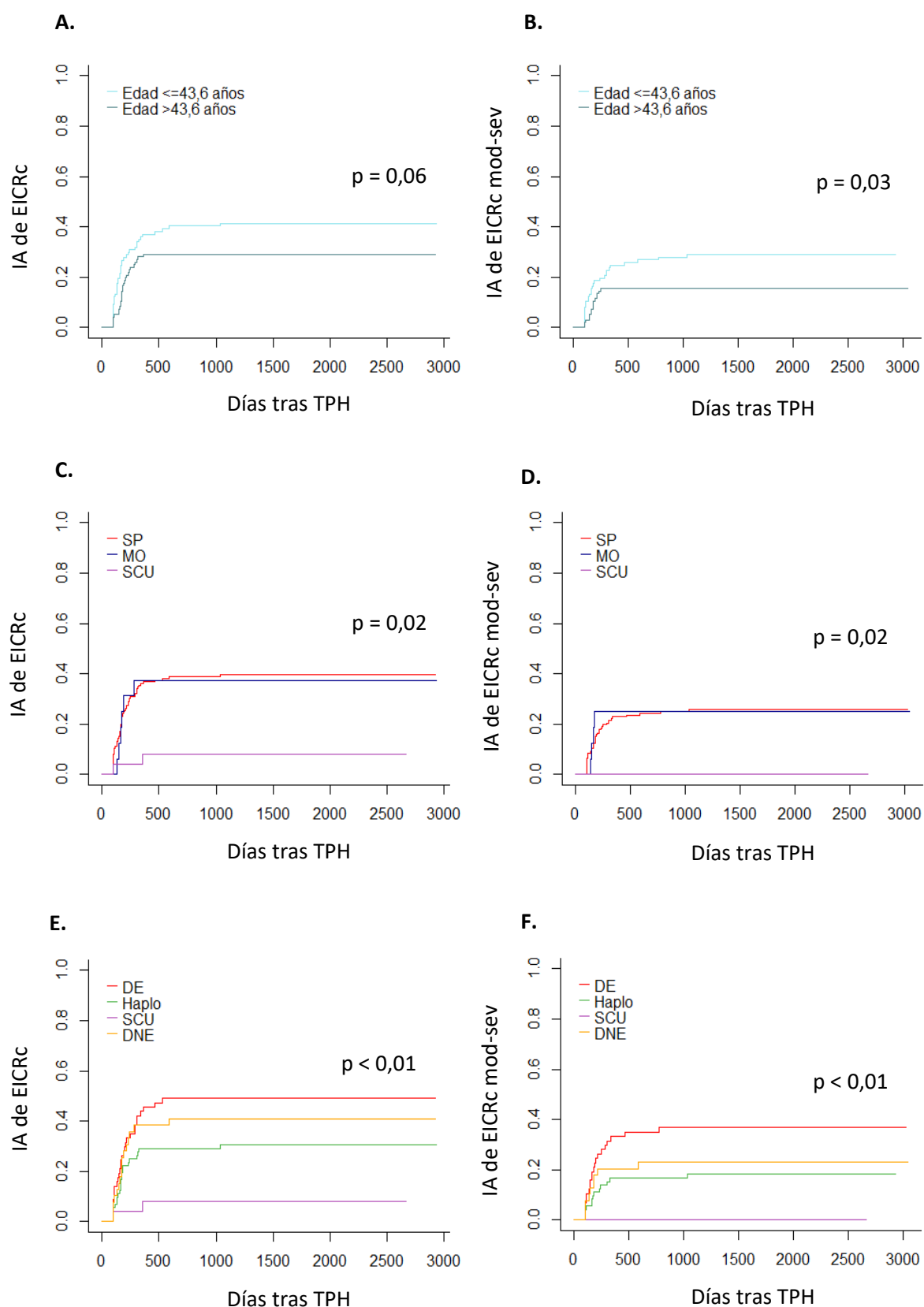


Figura 42.- IA de EICRc y EICRc moderada-severa según distintos factores pretrasplante: edad del receptor (A y B), fuente de PH (C y D), y tipo de donante (E y F).

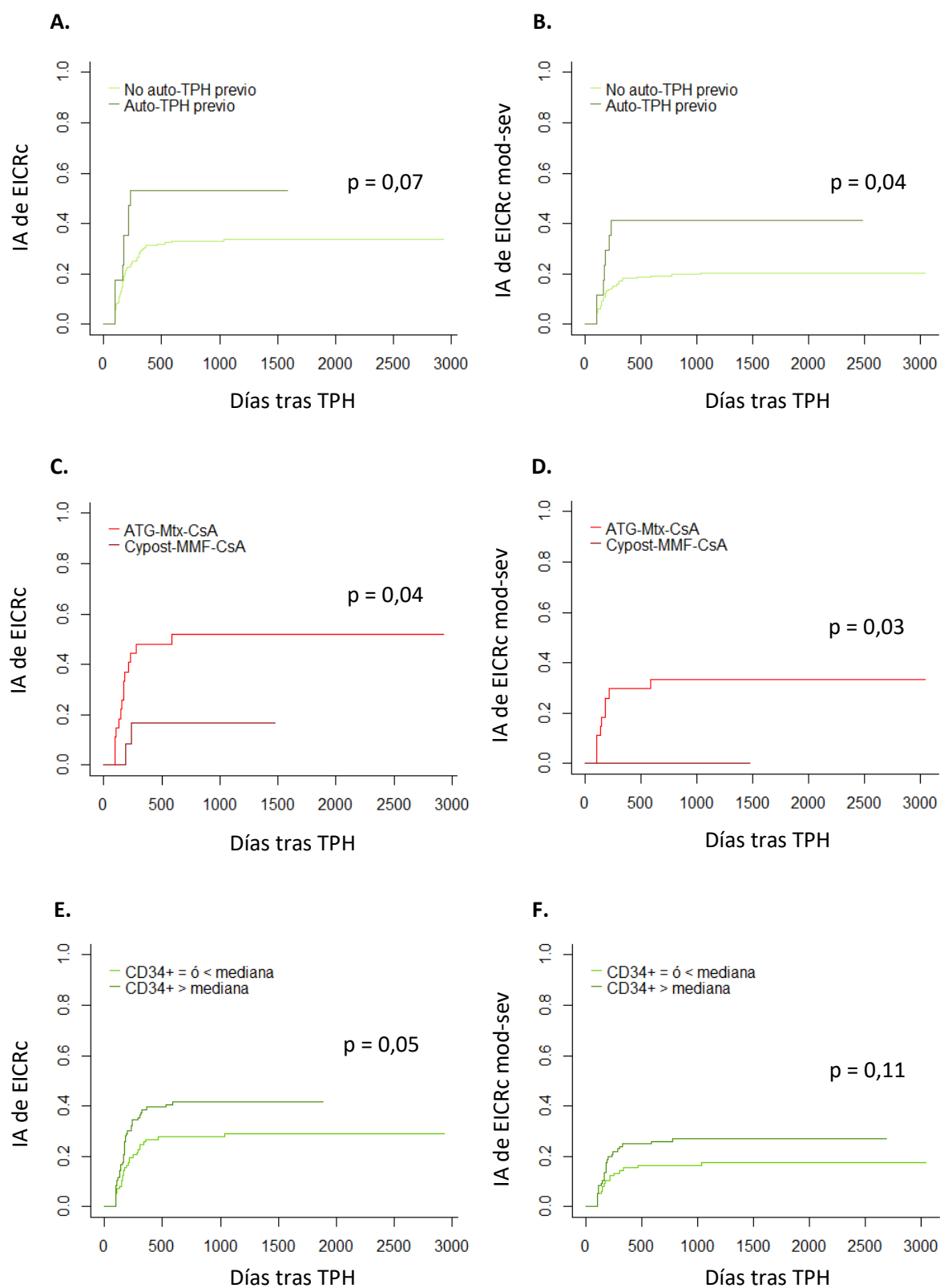


Figura 43.- IA de EICrC y EICrC moderada-severa según distintos factores pretrasplante: TPH autólogo previo (A y B), profilaxis de EICr en TPH de DNE (C y D), células CD34+ infundidas (E y F).

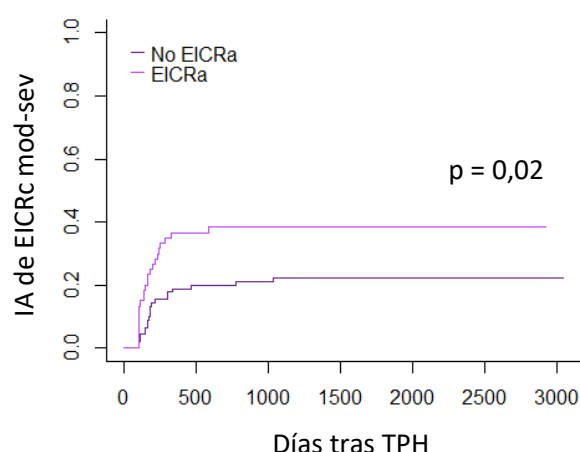


Figura 44.- IA de EICRc moderada-severa según el desarrollo previo de EICRa.

Quimerismo y EICR crónica

En cuanto al quimerismo y el desarrollo de EICRc, se analizó la relación del estatus del quimerismo en distintos linajes y distintos puntos del TPH con la IA de EICRc. Se estudió el estatus del quimerismo en SP a día +30 (1) y a día +90 (2); en LT (3) y CM (4) entre los días +15 y +21; y en MO a día +90 (5). A continuación, se presentan los resultados en la cohorte global, en la cohorte de pacientes con diagnóstico de LMA, y desglosados por tipo de donante.

En EICRc global, **no se encontraron diferencias estadísticamente significativas** en la IA de EICRc en función del estatus del quimerismo en los distintos linajes. No obstante, se encontró una tendencia ($p < 0,10$) a mayor incidencia de EICRc entre aquellos pacientes con QC en SP a día +90 y en CM entre los días +21 y +30 en la cohorte global, y en los pacientes con QC en SP a día +90 en los TPH de DNE. Los resultados se presentan en la Tabla 44 y en las Figuras 45 y 46.

	Cohorte global	LMA	DE	DNE	Haplo	SCU
Linaje/día	p	p	p	p	p	p
SP+30	0,35	0,70	0,59	0,25	0,80	0,23
SP+90	0,08	0,19	0,33	0,07	0,33	0,76
LT+30	0,95	0,58	0,91	0,70	0,24	0,27
CM+30	0,07	0,26	0,27	1,00	0,43	0,25
MO+90	0,88	0,46	0,70	0,87	0,94	0,20

Tabla 44.- Comparación de la IA de EICRc global en la cohorte global, de pacientes con diagnóstico de LMA, y según el tipo de donante, según el estatus de quimerismo en distintos compartimentos celulares.

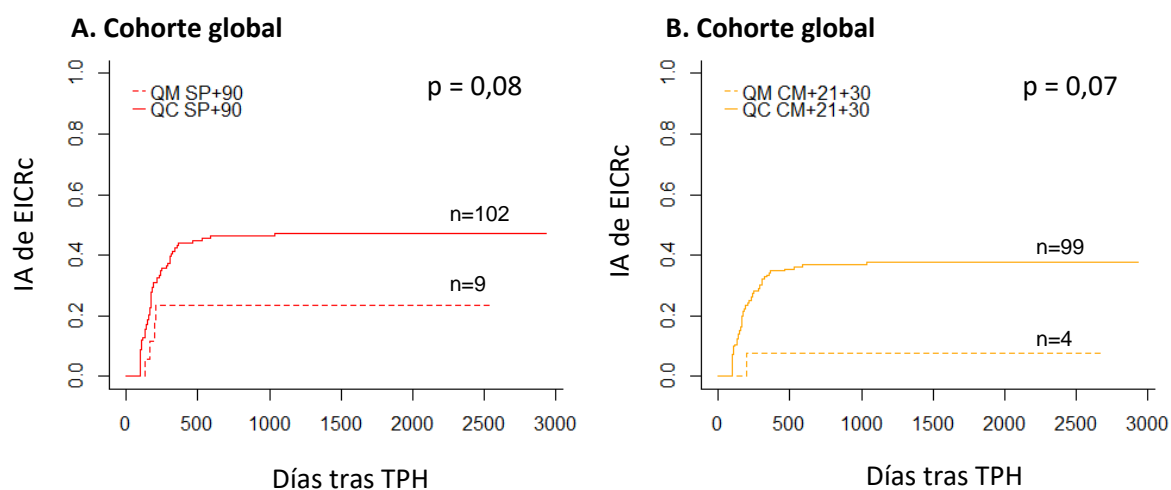


Figura 45.- IA de EICRc en la cohorte global según el estatus de quimerismo en SP a día +90 (A), y en CM a día +21+30 (B).

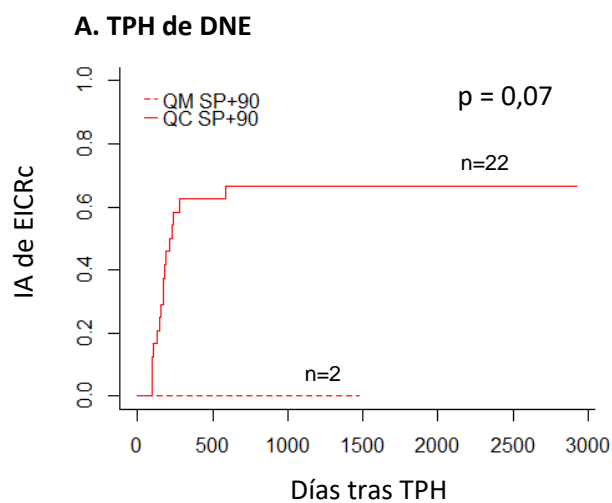


Figura 46.- IA de EICRc en TPH de DNE según el estatus de quimerismo en SP a día +90.

Quimerismo y EICR crónica moderada-severa

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en términos de EICRc moderada-severa. Los resultados se resumen en la Tabla 45.

	Cohorte global	LMA	DE	DNE	Haplo	SCU
Linaje/día	p	p	p	p	p	p
SP+30	0,58	0,11	0,48	0,04	0,33	-
SP+90	0,63	0,39	0,79	0,19	0,51	-
LT+30	0,43	0,28	0,15	0,35	0,14	-
CM+30	0,20	0,34	0,19	-	0,48	-
MO+90	0,77	0,92	0,20	0,36	0,73	-

Tabla 45.- Comparación de la IA de EICRc moderada-severa en la cohorte global, de pacientes con diagnóstico de LMA, y según el tipo de donante, según el estatus de quimerismo en distintos compartimentos celulares.

d) Recaída

De la misma manera que con la EICR, se analizaron los factores clínicos que podían influir en la IA de recaída. El único factor que se relacionó con recaída fue el **haber recibido más de dos líneas de tratamiento QT previo al TPH** ($p = 0,04$). Los resultados se presentan en la Tabla 46 y en la Figura 50.

Cohorte global	
Factor pretrasplante	p (recaída)
Edad > 44,9 años	0,54
Receptor varón + donante mujer	0,89
Sexo donante	0,49
Sexo receptor	0,78
Fuente CPH	0,85
Fuente CPH (SP vs. SCU)	0,82
Tipo TPH	0,86
Patología de base	0,29
Diagnóstico leucemia	0,50
Diagnóstico linfoma	0,44
Diagnóstico SMD/SMP	0,71
Diagnóstico MM	0,09

Diagnóstico patología no maligna	0,22
TPH autólogo previo	0,31
QT previa	0,15
Líneas de QT < 2	0,04
AIR vs. AMA	0,81
Profilaxis EICR DNE	0,70
CD34+ infundidas ≤ 4,77	0,12
CNT infundidas ≤ 6,76	0,93
RC pretrasplante	0,12
CMV negativo	0,53

Tabla 46.- Relación entre distintos factores e IA de recaída.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la IA de recaída por tipo de donante (Tabla 47, Figura 47).

Tipo TPH (p)	DE	DNE	Haplo
DNE	0,44		
Haplo	0,72	0,56	
SCU	0,97	0,60	0,79

Tabla 47.- IA de recaída por tipo de donante.

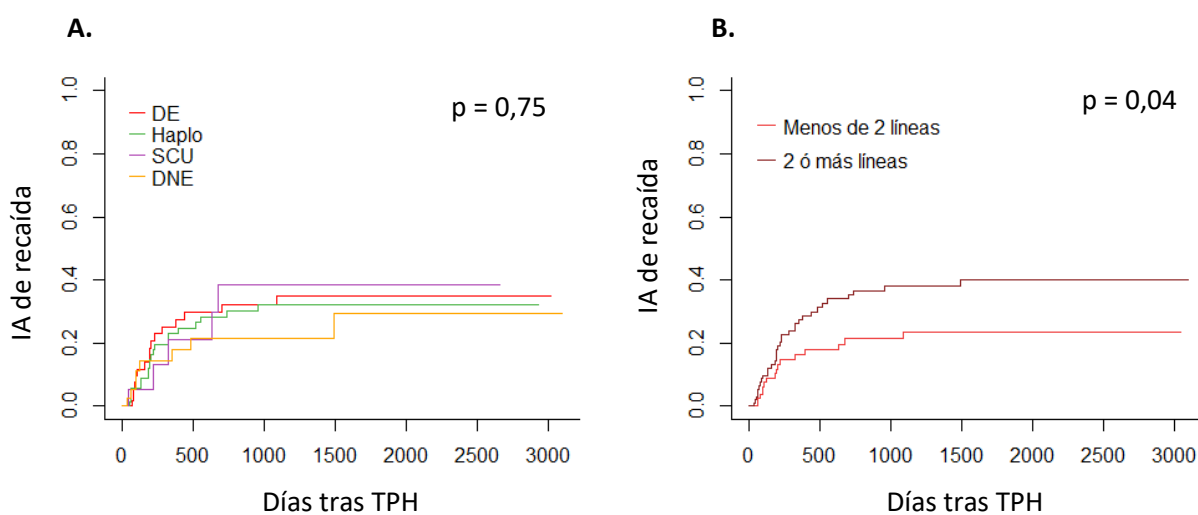


Figura 47.- IA de recaída según el tipo de TPH (A) y el número de líneas de QT (B).

i. Quimerismo y recaída

Se analizó la IA de recaída en función del estatus del quimerismo (QC ó QM) en SP entre los días +15 y +21 y a día +30, en LT y CM entre los días +21 y +30, en MO a día +30 y en CD34+ entre los días +21 y +30. En la población de pacientes con **diagnóstico de LMA**, se encontró una **mayor IA de recaída entre aquellos que mantenían QM en CD34+ a día +30**. En los pacientes con **TPH de DE**, se encontró una **mayor IA de recaída en aquellos en QM en MO a día +30**. En cuanto al quimerismo en CM a día +21 en el TPH de DNE, pese a que los resultados son estadísticamente significativos ($p < 0,01$), sólo había un paciente en la rama de QM, por lo que no se consideró relevante. Los resultados se presentan en la Tabla 48 y en las Figuras 48 y 49.

	Cohorte global	LMA	DE	DNE	Haplo	SCU
Linaje	p	p	p	p	p	p
SP+15+21	0,62	0,49	0,29	0,51	0,70	0,30
SP+30	0,39	0,85	0,18	0,26	0,29	0,19
LT+21+30	0,19	0,12	0,26	0,97	0,06	0,71
CM+21+30	0,98	0,67	0,51	<0,01	0,41	0,14
MO+30	0,25	0,11	0,05	0,84	0,36	0,31
MO+90	0,62	0,58	0,28	0,10	0,26	-
CD34+30	0,23	<0,01	0,11	0,33	0,18	0,46

Tabla 48.- Comparación de la IA de recaída en la cohorte global, de pacientes con diagnóstico de LMA, y según el tipo de donante, según el estatus de quimerismo en distintos compartimentos celulares.

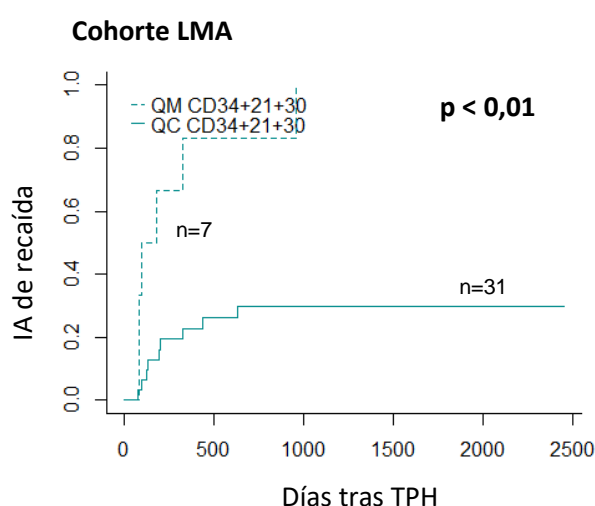


Figura 48.- IA de recaída en la cohorte de pacientes con diagnóstico de LMA (n=65) según el estatus de quimerismo en CD34+ a día +21+30 (B).

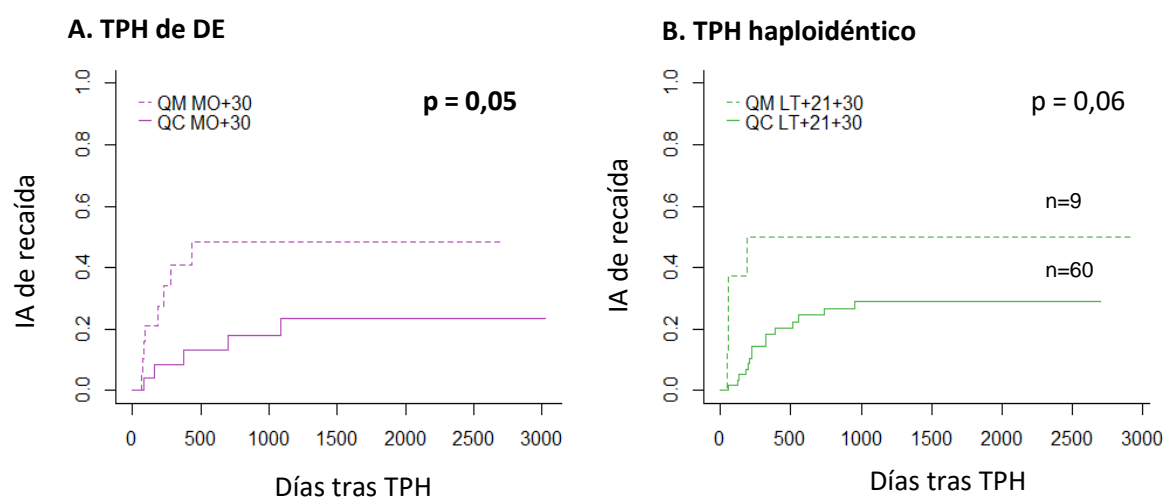


Figura 49.- IA de recaída en TPH de DE según el estatus de quimerismo en MO a día +30 (A) y en TPH haploidéntico según el estatus de quimerismo en LT a día +21+30 (B).

e) Mortalidad relacionada con el trasplante

Se analizó la relación entre los factores pretrasplante y la MRT. Se encontró mayor IA de MRT entre los pacientes de mayor edad ($p=0,02$), con SCU frente a SP como fuente de PH ($p = 0,05$), con diagnóstico distinto de leucemia aguda ($p=0,01$), con diagnóstico de SMD/SMP ($p=0,04$), que no habían recibido QT previo al TPH ($p<0,01$) y con situación de la enfermedad pretrasplante distinta de RC ($p=0,03$). Se presenta un resumen de los resultados en la Tabla 49 y las Figuras 50 y 51.

Cohorte global	
Factor pretrasplante	p (MRT)
Edad > 44,9 años	0,02
Receptor varón + donante mujer	0,30
Sexo donante	0,78
Sexo receptor	0,26
Fuente CPH	0,12
Fuente CPH (SP vs. SCU)	0,05
Tipo TPH	0,18
Patología de base	0,07
Diagnóstico leucemia	0,01
Diagnóstico linfoma	0,53
Diagnóstico SMD/SMP	0,04
Diagnóstico MM	0,91
Diagnóstico patología no maligna	0,19
TPH autólogo previo	0,25
QT previa	<0,01
Líneas de QT < 2	0,63
AIR vs. AMA	0,12
Profilaxis EICR DNE	0,17
CD34+ infundidas $\leq 4,77$	0,11
CNT infundidas $\leq 6,76$	0,07
RC pretrasplante	0,03
CMV negativo	0,50

Tabla 49.- Relación entre distintos factores e IA de MRT.

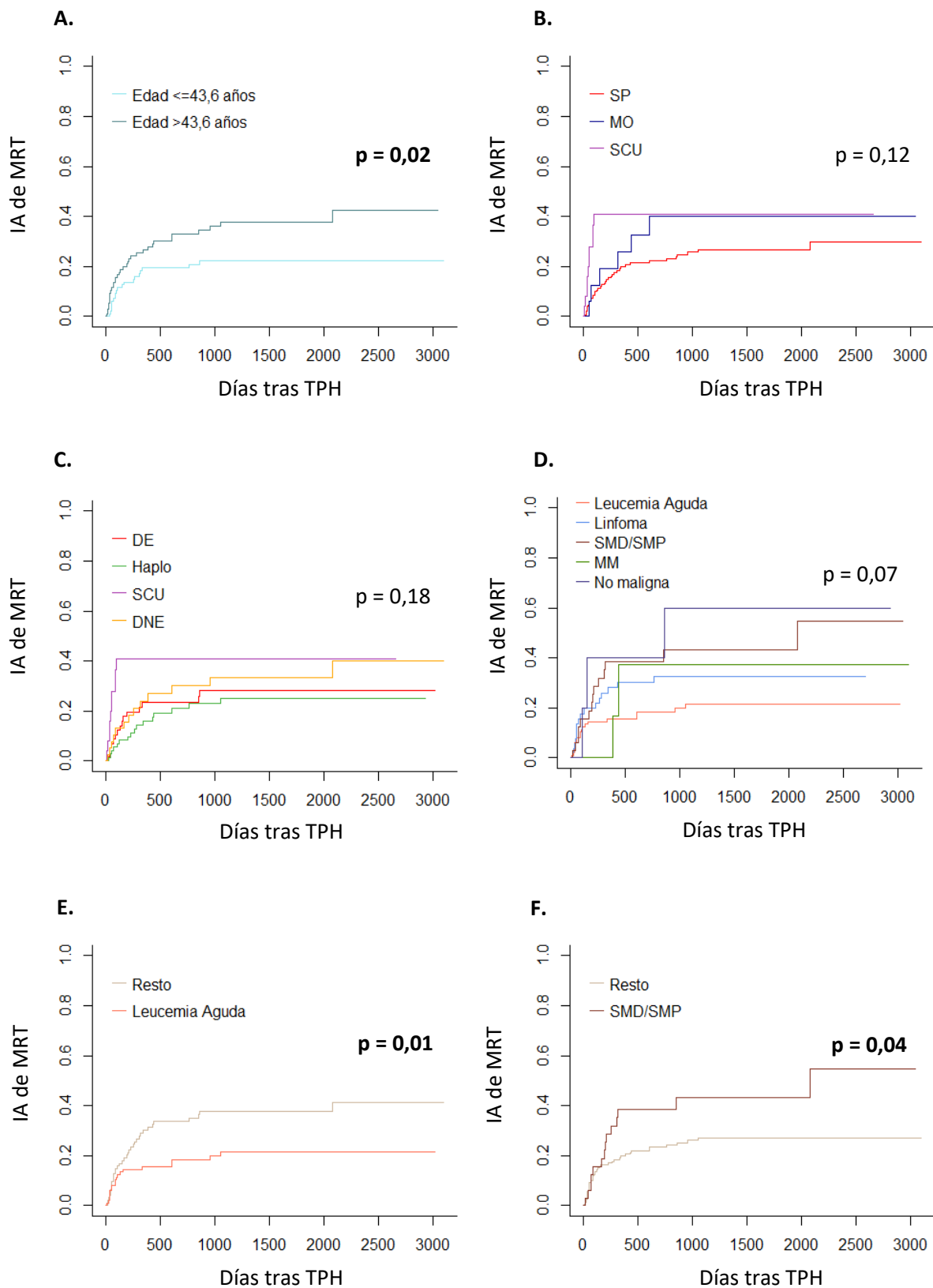


Figura 50.- IA de MRT según la edad del receptor (A), la fuente de PH (B), el tipo de donante (C), el diagnóstico de base (D), el diagnóstico de leucemia aguda (E), y el diagnóstico de SMD/SMP (F).

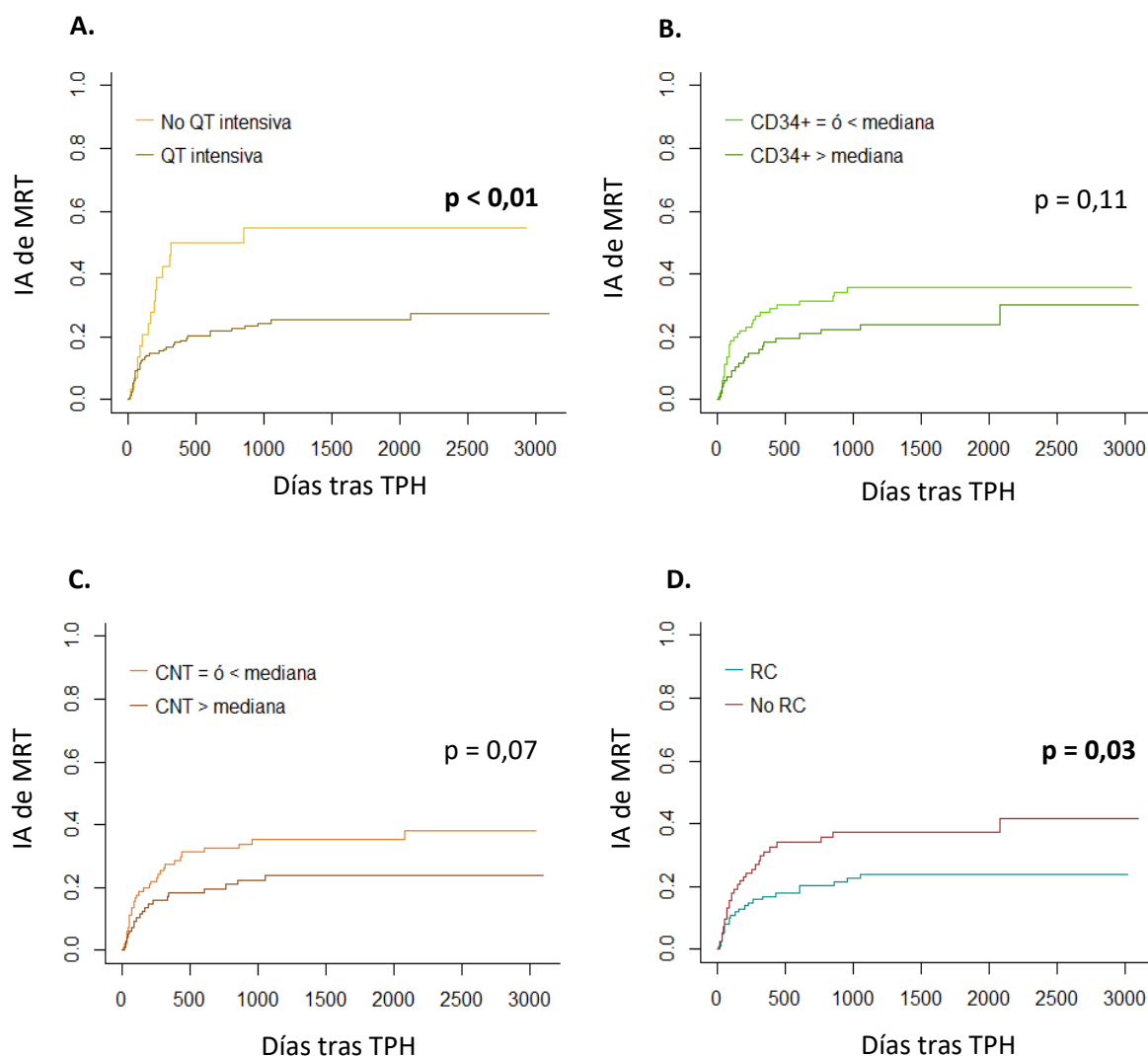


Figura 51.- IA de MRT según el haber recibido QT intensiva (A), el número de CD34+ (B) y de CNT infundidas (C), y el estado de la enfermedad pretrasplante (D).

En la comparación de la MRT por tipo de donante, se encontró una mayor MRT en el TPH de SCU frente al TPH haploidéntico ($p=0,03$). Los resultados se muestran en la Tabla 50 y en la Figura 55.

Tipo TPH (p)	DNE	SCU	DE
SCU	0,38		
DE	0,52	0,11	
Haplo	0,25	0,03	0,54

Tabla 50.- IA de MRT por tipo de donante.

i. Quimerismo y mortalidad relacionada con el trasplante

Se analizó la relación entre la IA de MRT y el estatus del quimerismo (QC ó QM) en SP entre los días +15 y +21 y a día +30, en LT y CM entre los días +21 y +30, en MO a día +30 y en CD34+ entre los días +21 y +30. **No se encontró relación entre quimerismo y la MRT.** Sin embargo, se encontró que los pacientes con QC en SP entre los días +15 y +21 en la cohorte de pacientes con TPH de DNE, y que los pacientes con QC en SP a día +30 en la cohorte global, de pacientes con TPH de DNE y de SCU presentaron una menor MRT, si bien las diferencias no fueron estadísticamente significativas. Los resultados se presentan en la Tabla 51 y en la Figura 52.

	Cohorte global	LMA	DE	DNE	Haplo	SCU
Linaje/día	p	p	p	p	p	p
SP+15+21	0,78	0,56	0,27	0,09	0,57	0,91
SP+30	0,11	0,72	0,94	0,10	0,79	0,13
LT+30	0,76	0,92	0,56	0,40	0,74	0,78
CM+30	0,33	0,48	0,56	0,86	0,53	0,64
MO+30	0,31	0,76	0,18	0,70	0,90	0,85

Tabla 51.- Comparación de la IA de MRT en la cohorte global, de pacientes con diagnóstico de LMA, y según el tipo de donante, según el estatus de quimerismo en distintos compartimentos celulares.

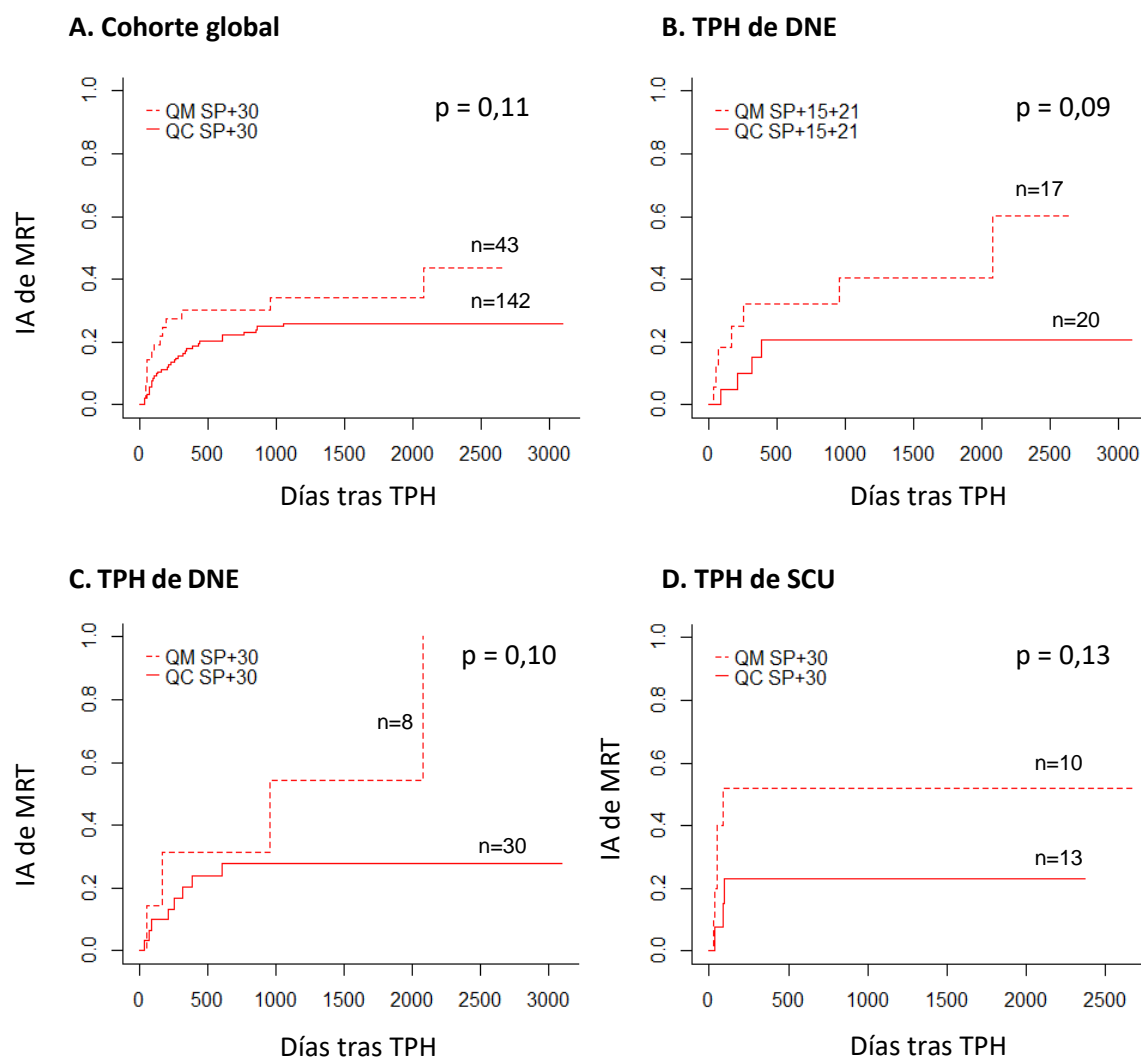


Figura 52.- IA de MRT según el estatus de quimerismo en SP a día +30 en la cohorte global (A), según el estatus de quimerismo en SP a día +15+21 y a día +30 en la cohorte de pacientes con TPH de DNE (B y C) y según el estatus de quimerismo en SP a día +30 en la cohorte de pacientes con TPH de SCU (D)

f) Supervivencia global

Se estudió la relación entre los distintos factores pretrasplante y la SG. Se encontró que los pacientes de mayor edad y aquellos que no estaban en RC pretrasplante presentaban una SG significativamente más baja ($p < 0,01$). Los resultados se resumen en la Tabla 52 y en las Figuras 53 y 54.

Cohorte global	
Factor pretrasplante	p (SG)
Edad > 44,9 años	<0,01
Receptor varón + donante mujer	0,63
Sexo donante	0,81
Sexo receptor	0,77
Fuente CPH	0,20
Fuente CPH (SP vs. SCU)	0,08
Tipo TPH	0,35
Patología de base	0,23
Diagnóstico leucemia	0,08
Diagnóstico linfoma	0,91
Diagnóstico SMD/SMP	0,05
Diagnóstico MM	0,32
Diagnóstico patología no maligna	0,85
TPH autólogo previo	0,12
QT previa	0,02
Líneas de QT < 2	0,75
AIR vs. AMA	0,34
Profilaxis EICR DNE	0,17
CD34+ infundidas $\leq 4,77$	0,51
CNT infundidas $\leq 6,76$	0,21
RC pretrasplante	<0,01
CMV negativo	0,63

Tabla 52.- SG según distintos factores pretrasplante.

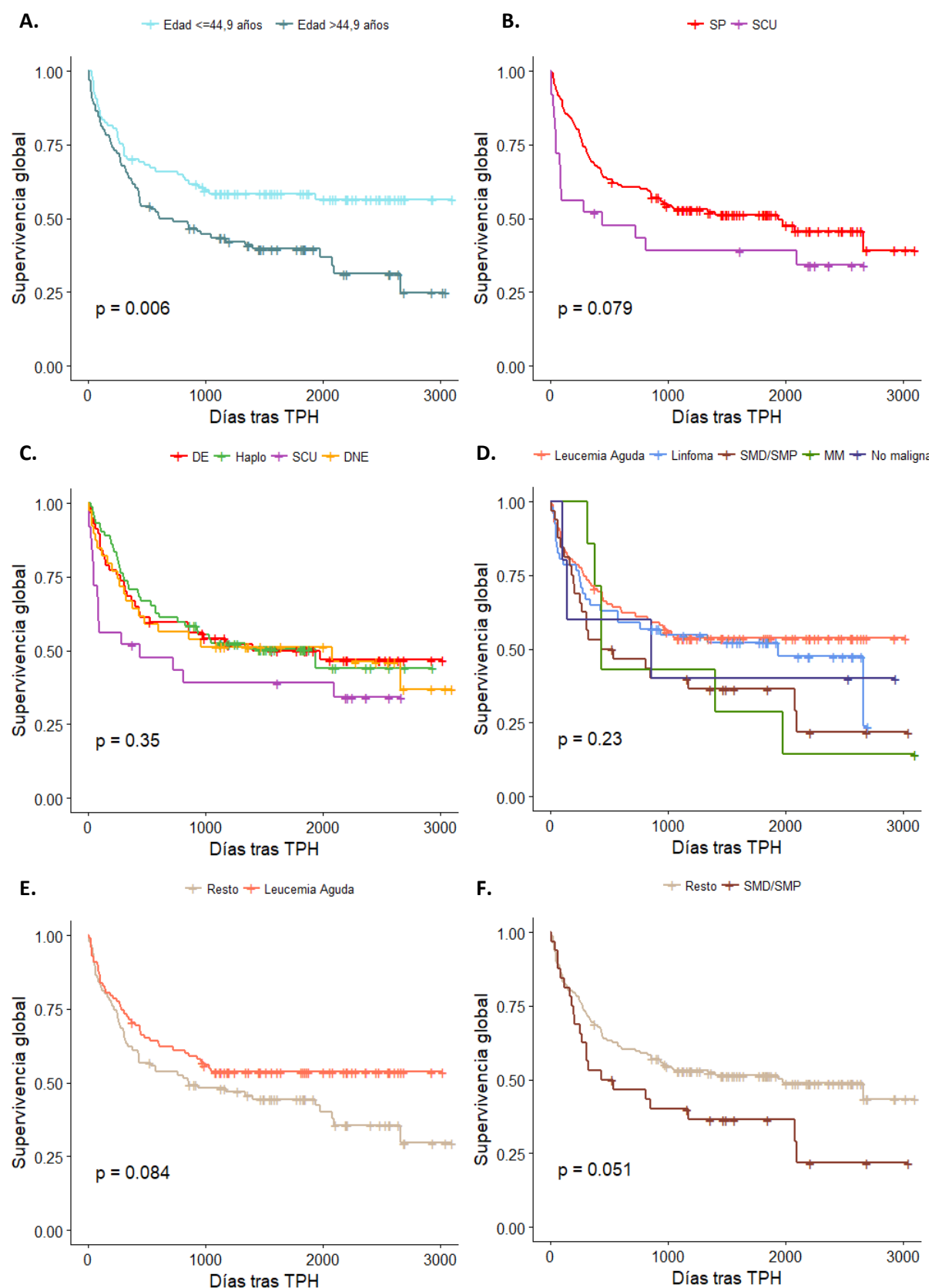


Figura 53.- SG según la edad del receptor (A), la fuente de PH (B), el tipo de donante (C), el diagnóstico de base (D), y el diagnóstico de leucemia aguda (E) y de SMD/SMP (F).

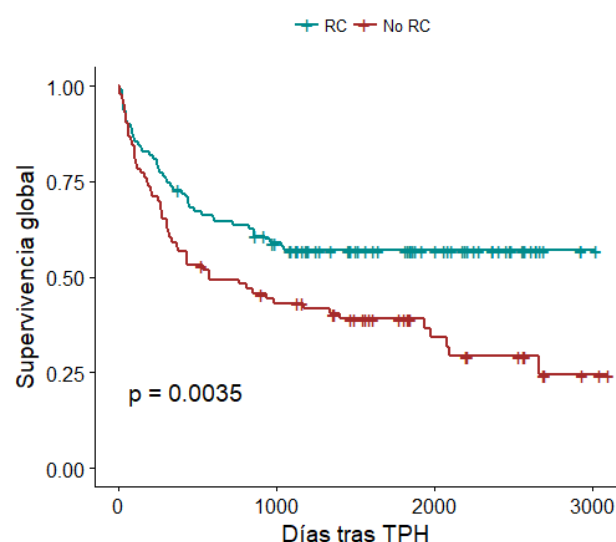


Figura 54.- SG según el estado de la enfermedad al TPH.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la SG por tipo de TPH, si bien sí que se encontró una tendencia a una mejor SG entre los pacientes que recibían TPH haploidéntico frente a TPH de SCU. Los resultados se presentan en la Tabla 53 y en la Figura 53.

Tipo TPH (p)	SCU	DNE	DE
DNE	0,22		
DE	0,12	0,84	
Haplo	0,09	0,81	0,9

Tabla 53.- SG por tipo de donante.

i. Quimerismo y supervivencia global

Se analizó la SG en los pacientes en función del estatus del quimerismo (QC ó QM) en SP entre los días +15 y +21 y a día +30, en LT y en CM entre los días +21 y +30, y en MO a día +30.

En la **cohorte global**, se encontró una **SG significativamente mayor entre los pacientes en QC** en **SP+30** ($p<0,01$), en **LT+21+30** ($p=0,03$), y en **MO+30** ($p<0,01$).

En la cohorte de pacientes con **diagnóstico de LMA**, se encontró una mayor SG entre aquellos en **QC en MO+30** ($p=0,04$).

En los pacientes con **TPH de DE**, aquellos con **QC en MO a día +30** presentaron mejor SG ($p<0,01$). En los pacientes con **TPH de DNE**, presentaron mayor SG aquellos con **QC precoz en SP**, tanto entre los días +15 y +21 como a día +30 ($p=0,02$ y $p<0,01$, respectivamente). Los resultados se presentan en la Tabla 54 y en las Figuras 55-57.

	Cohorte global	LMA	DE	DNE	Haplo	SCU
Linaje/día	p	p	p	p	p	p
SP+15+21	0,17	0,29	0,83	0,02	0,22	0,65
SP+30	<0,01	0,09	0,12	0,01	0,19	0,26
LT+30	0,03	0,09	0,07	0,85	0,07	0,36
CM+30	0,18	0,56	0,37	<0,01	0,37	0,65
MO+30	<0,01	0,04	<0,01	0,25	0,27	0,82

Tabla 54.- Comparación de la SG en la cohorte global, de pacientes con diagnóstico de LMA, y según el tipo de donante, según el estatus de quimerismo en distintos compartimentos celulares.

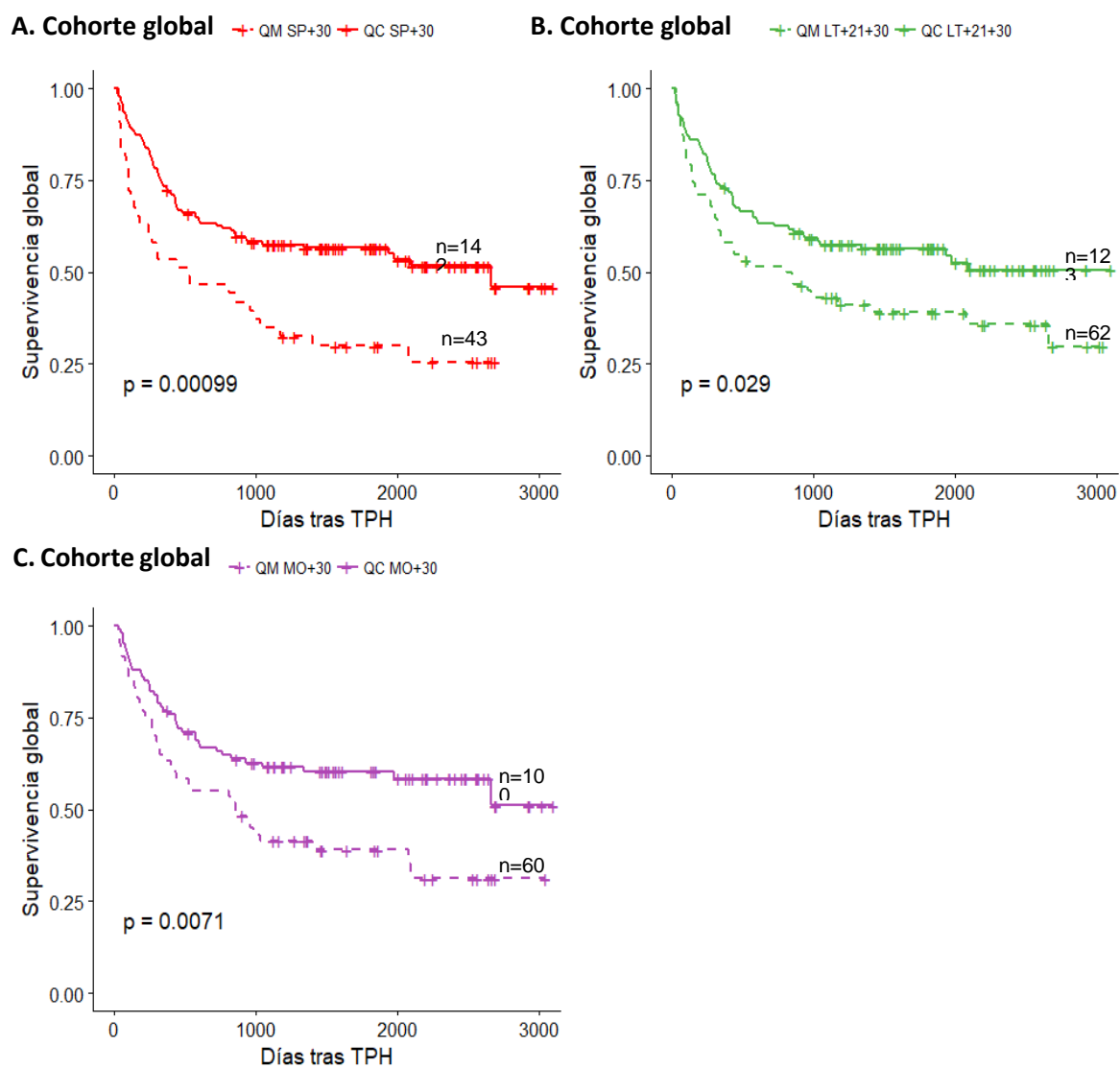


Figura 55.- SG en la cohorte global (n=193) según el estatus de quimerismo en SP+30 (A), en LT+21+30 (B) y en MO +30 (C).

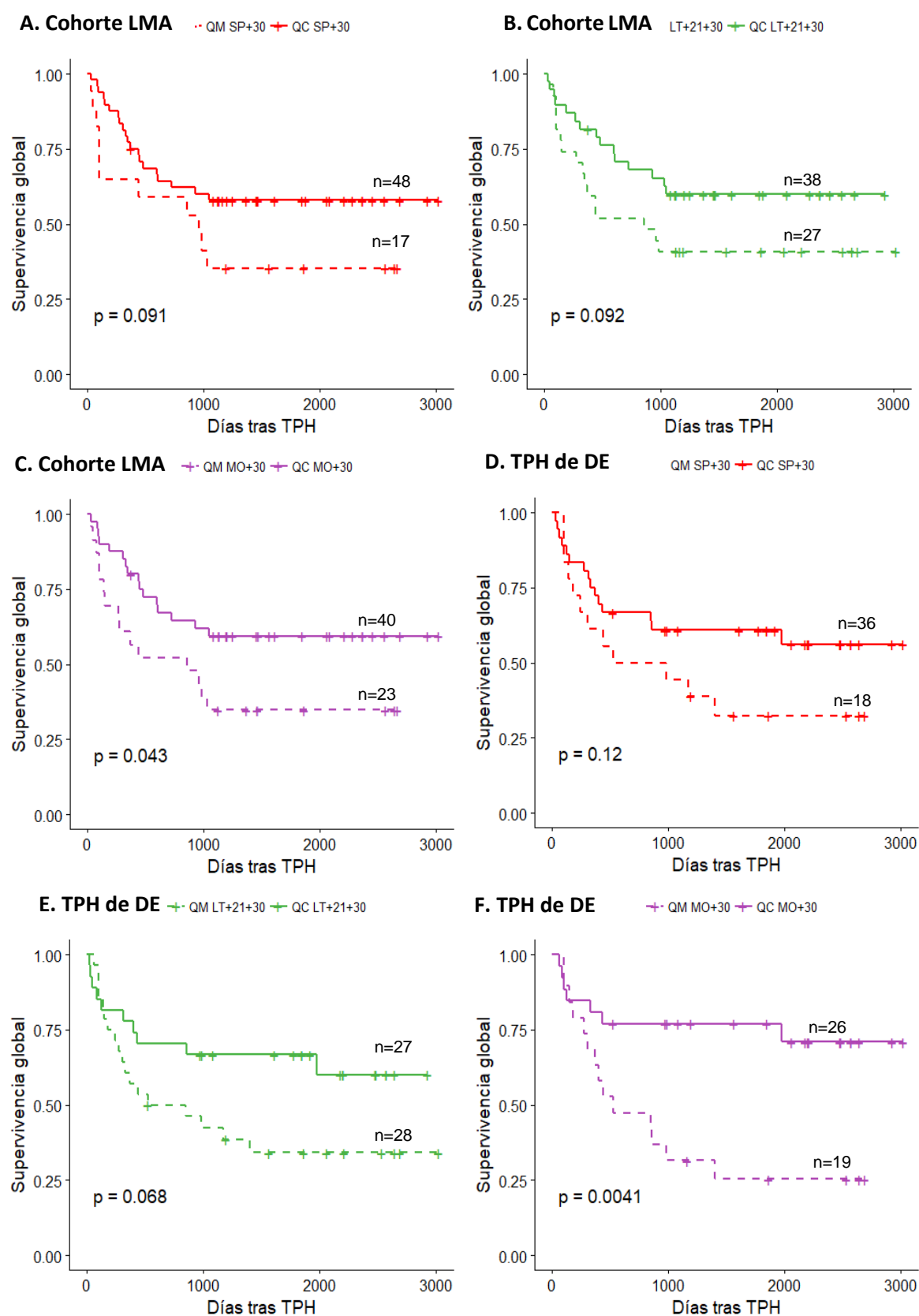


Figura 56.- SG en la cohorte de pacientes con LMA según el estatus de quimerismo en SP a día +30 (A), en LT a día +21+30 (B) y en MO a día +30 (C) y en la cohorte de pacientes con TPH de DE según el estatus de quimerismo en SP a día +30 (D), en LT a día +21+30 (E) y en MO a día +30 (F).

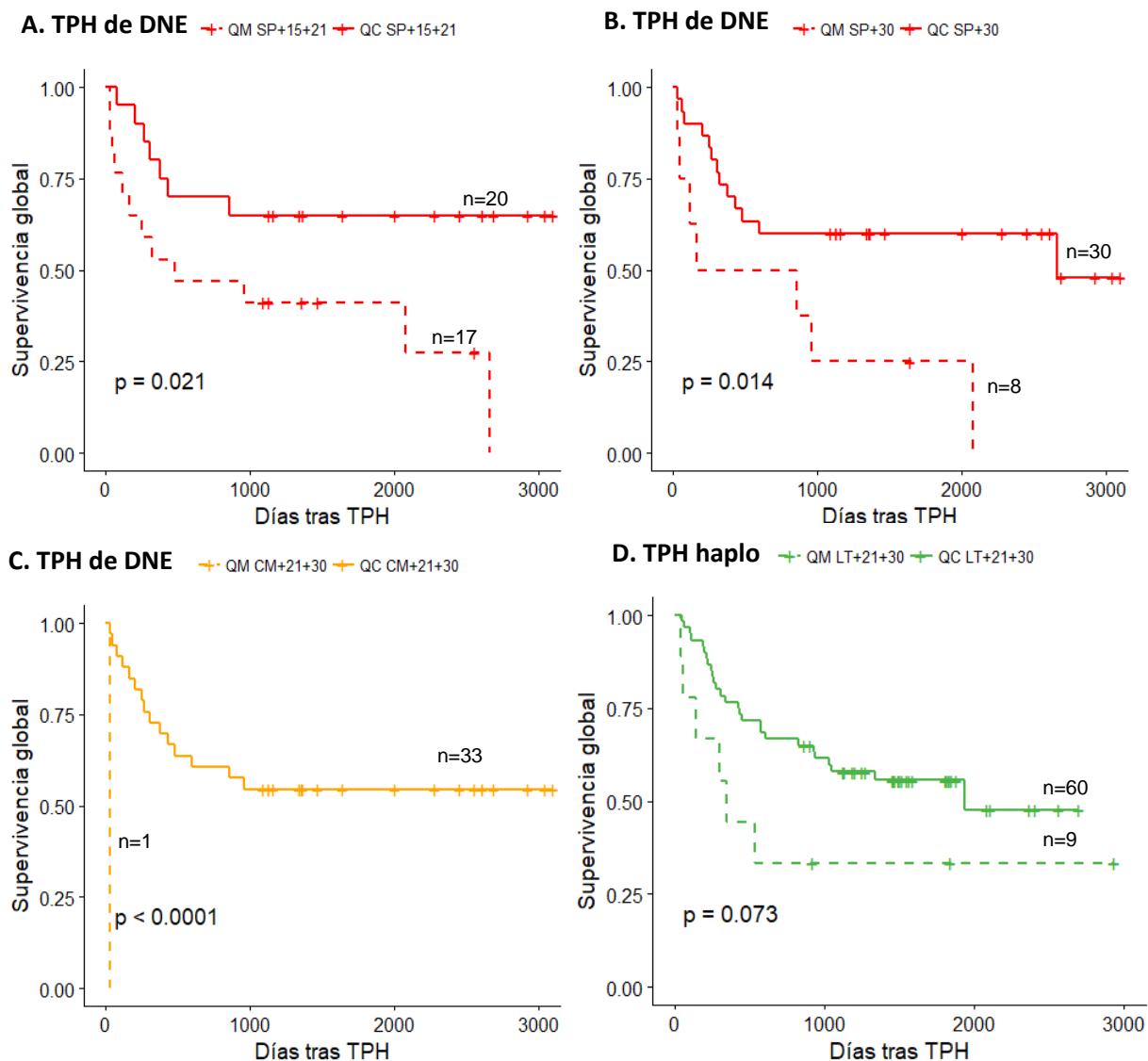


Figura 57.- SG en la cohorte de pacientes con TPH de DNE según el estatus de quimerismo en SP a día +15+21 (A), en SP a día +30 (B), y en CM a día +21+30 (C); y en la cohorte de pacientes con TPH haploidéntico según el estatus de quimerismo en LT a día +21+30 (D).

Discusión

El alo-TPH es a día de hoy el tratamiento de elección en muchas neoplasias hematológicas en primera línea o en el momento de la recaída, y en muchos casos constituye la única opción curativa. Sin embargo, se trata de un procedimiento altamente complejo que precisa de un manejo estrecho del paciente. Una de las herramientas para la monitorización del TPH es el análisis de la cinética del quimerismo. Como se ha explicado previamente, el objetivo en los pacientes que se trasplantan por una neoplasia hematológica es el recambio del 100 % de las células del sistema hematopoyético, formando una quimera artificial en la que cohabitarían una hematopoyesis derivada de las células del donante con el resto de tejidos del organismo, formados por células del receptor. De esta manera, y con el objetivo de mantener un QC del donante, el seguimiento del quimerismo permite monitorizar el prendimiento, evaluar el riesgo de desarrollo de algunas complicaciones y anticipar la recaída del tumor de base.

La detección precoz de algunas de las complicaciones postrasplante permite un manejo anticipado y adaptado de los tratamientos (disminución de la inmunosupresión, infusión de células específicas, empleo de tratamientos diana...), los cuales en muchas ocasiones pueden revertir la complicación antes de que se establezca por completo. Éste es el caso de fallos primarios o secundarios del injerto, en los que la primera señal a veces es un aumento de células del receptor asociado a descenso de cifras hemoperiféricas. En algunas ocasiones, la disminución precoz de la inmunosupresión es capaz de favorecer la alorreactividad del donante y el correcto prendimiento o el restablecimiento del prendimiento perdido de la hematopoyesis del donante (Figura 58). En el caso de la recaída, en ocasiones el primer signo es la reaparición de pequeñas cantidades de células del receptor, especialmente en neoplasias sin marcadores de seguimiento de enfermedad mínima residual. En estos supuestos, si el paciente no ha desarrollado EICR importante previamente, se debe retirar la inmunosupresión y plantear la administración de linfocitos del donante o de algún fármaco antitumoral. La actuación precoz en estos casos antes de que se produzca una recaída franca, ha demostrado mejoras en la supervivencia de estos pacientes (25–27,65,105).

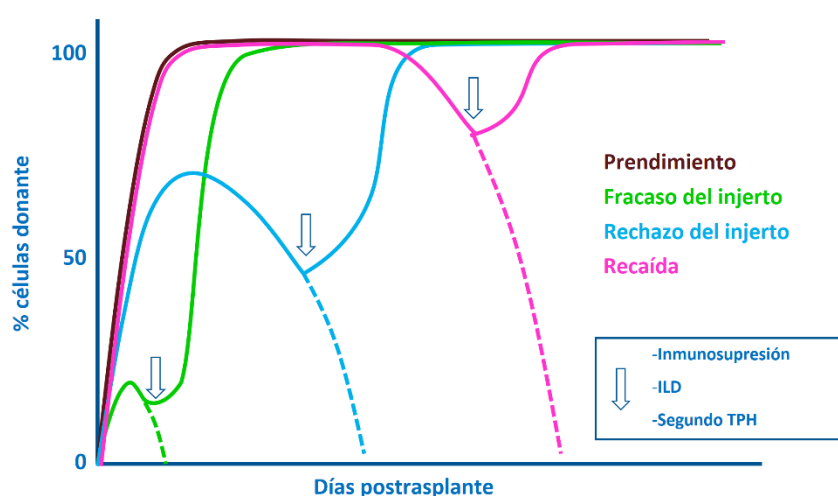


Figura 58.- Situaciones postrasplante y posibilidad de reversión con la modificación de la inmunosupresión. Imagen cortesía del Dr. Ismael Buño

Dentro de los estudios de quimerismo, un concepto biológicamente interesante es el estudio del mismo en los distintos linajes hematopoyéticos. Se conoce bien que la reconstitución inmune no se produce a la vez en todas las subpoblaciones celulares (106,107). La recuperación de los neutrófilos sería la más precoz, ocurriendo en torno a los 14-30 días según la fuente de CPH empleada y la celularidad infundida. Posteriormente se produciría la recuperación de las NK en torno a los 30-100 días y de los LT en torno a los 100 días. Por último, se recuperarían los LB a partir de 1-2 años postrasplante. Todo esto reviste importancia en cuanto al desarrollo de infecciones por distintos patógenos en función del momento postrasplante que se encuentre el paciente (106). Por otro lado, se sabe que son ciertos tipos celulares los que se encargan de la inmunovigilancia tumoral y los que están implicados en el desarrollo de la EICR. En concreto, los LT son las células que se han relacionado tanto con el EICT como con la EICR, si bien su papel y los mecanismos que llevan a desarrollar estas situaciones no se conocen del todo bien (108–110). De hecho, en la inmunovigilancia tumoral también están implicadas otras células como las NK, los macrófagos, las células dendríticas, los neutrófilos o los LB (111,112), pero su papel en la inmunovigilancia postrasplante no está bien descrito (113–115).

Por todo ello, y dado que de su resultado se derivan decisiones clínicas que pueden revertir complicaciones cuando se detectan en una fase incipiente, es relevante la implementación de un calendario de seguimiento del quimerismo, con una comunicación fluida entre los facultativos de laboratorio y los clínicos, así como rapidez en la ejecución del análisis y entrega de resultados.

Sin embargo, la implicación clínica del quimerismo en algunos aspectos está todavía por definir, y es muy importante la integración del resultado del quimerismo con las características del trasplante (acondicionamiento, profilaxis de EICH, fuente empleada, tipo de donante...), el momento evolutivo, la patología de base, la evaluación de la respuesta, y la presencia de otras complicaciones derivadas del procedimiento. Por todo ello, nuestro equipo decidió desarrollar un estudio que ayudara a contestar estas preguntas y a mejorar el manejo clínico de los pacientes trasplantados.

De esta manera, se planteó en este trabajo realizar un estudio descriptivo retrospectivo, recogiendo la información del quimerismo en SP, MO, y varios subtipos celulares de los pacientes trasplantados en los últimos 5 años en la unidad de trasplante de nuestro centro.

1.- Dinámica del quimerismo en sangre periférica, médula ósea y linajes leucocitarios

Cabe destacar que **nuestra serie es la más extensa de las reportadas**, en cuanto a la descripción de adquisición de QC en **linajes leucocitarios**, es la única que describe el quimerismo en linajes leucocitarios en pacientes con AMA, y se describe la dinámica en algunos linajes no publicados previamente (LB, Treg, LA). Además, se trata de una de las series más amplias en descripción del quimerismo en SP y en MO totales.

En este trabajo se encontró que el linaje celular con **prendimiento más precoz fueron las CM**, seguido de cerca por las NK y los LB, y posteriormente por la SP total y los LT. En los momentos más precoces, la curva de IA de QC en SP resulta superponible a la de las CM, dado que estas son las células mayoritarias circulantes durante este periodo del TPH. Conforme va habiendo más proporción de otras poblaciones celulares, la curva de IA de QC en SP se sitúa en un lugar intermedio entre las CM y las poblaciones linfoides. Son, por tanto, los **LT, el subtipo celular de la SP con un prendimiento más**

tardío. Esto ocurre de forma similar a lo reportado por la mayoría de trabajos publicados en la literatura, se describe un QC más precoz en las CM que en los LT (32,34,37,47,48), situando a las NK (34) y a los LB (47) en un lugar intermedio. Estos resultados difieren de los publicados en el estudio de Childs *et al.* (46) en que el quimerismo en LT era más precoz que el de las CM. Esto probablemente se explique por el pequeño tamaño de muestra en dicho estudio (n=15) y por el tipo de paciente, ya que se trataba de pacientes altamente pretratados, y en la mitad de los casos el diagnóstico era de tumores sólidos metastásicos.

En cuanto a la **IA de QC en Treg y LA**, estos presentan en nuestra cohorte una dinámica de prendimiento similar a la de los LT. En este estudio no se observaron diferencias entre estos tres compartimentos, probablemente porque el número de determinaciones fue escaso. Sin embargo, nuestro grupo publicó un trabajo que compara la adquisición de QC en LT y LA y en el cual se observa que la adquisición de QC en LA es un factor de riesgo para el desarrollo de EICRa grados II-IV, y que en los pacientes que adquirirían QC en LA antes que en LT presentaban una mayor incidencia de EICRa (60).

Además, el trabajo que aquí se presenta aporta gran información, ya que se encuentran incluidas las **cuatro modalidades de alo-TPH más comunes**: TPH HLA idéntico de DE ó de DNE como trasplantes convencionales, y TPH de SCU y haploidénticos como trasplantes alternativos. No existe ningún trabajo publicado hasta la fecha que describa de forma comparativa la dinámica del quimerismo en estas modalidades de TPH. De hecho, en este trabajo se encontró una dinámica del quimerismo diferenciada para cada una de ellas.

En el **TPH de DE**, en el cual se empleó la profilaxis de EICR clásica con ciclosporina y metotrexate en pauta corta, se encontró que el quimerismo se adquiría de forma mucho más precoz en las células mieloides frente al resto de linajes, estando en una posición intermedia los LB, las NK y la SP total, y en última posición (siendo por tanto más tardío), los LT.

Similares resultados se observan en el **TPH de DNE**, si bien cabe destacar que no se encuentran diferencias tan pronunciadas, probablemente en relación con que un tercio de los pacientes recibieron profilaxis de EICR basada en ciclofosfamida postrasplante.

Resulta muy llamativo el comportamiento del quimerismo en el **TPH haploidéntico**, ya que se observa una adquisición de QC muy precoz en todos los compartimentos celulares, sin que haya diferencias entre los mismos (por lo tanto, en estos casos hay una adquisición de QC en LT mucho más precoz que en las otras modalidades de TPH). Cuando se comparan los resultados de cada subtipo celular por donante empleado, el haploidéntico es el TPH con QC más precoz en todos ellos y estas diferencias se mantuvieron en el análisis multivariable. Las causas por las que sucede este fenómeno no están claras. Una posible hipótesis radicaría en la propia disparidad HLA. Existe un estudio en pacientes pediátricos que recibieron TPH de SCU, en que la disparidad HLA (4/6 frente a 5-6/6) se relacionaba con adquisición más temprana de QC (43). Es posible que éste sea uno de los mecanismos que influyen en la dinámica del quimerismo, pero también es posible que se relacione con el empleo de ciclofosfamida postrasplante. Todavía no se conocen bien los mecanismos celulares mediante los cuales actúa este tipo de profilaxis, en concreto si actúa eliminando los LT aloreactivos o si tiene otros efectos inmunoreguladores (116–118), y tampoco está descrita su influencia en la adquisición de QC.

Respecto al **TPH de SCU**, la principal diferencia es la adquisición más tardía de QC en CM frente al resto de donantes, en relación con una dinámica de prendimiento más lenta, la cual es bien conocida y presenta uno de los retos de manejo en estos pacientes. En nuestro centro se emplea el protocolo

de TPH de SCU dual, empleando la coinfusión de una unidad de SCU junto con células CD34+ de un segundo donante con disparidad HLA. En esta modalidad, se observa de forma habitual ADN del segundo donante transitoriamente hasta la adquisición de quimerismo completo del donante de SCU. Dado que este hallazgo no afecta significativamente las decisiones clínicas sobre el paciente, en este trabajo los análisis se han realizado solo con el ADN del donante de SCU.

Respecto al **quimerismo en MO**, nuestro grupo ha observado que la detección de células del receptor persiste durante más tiempo en la MO que en la SP, de forma similar a lo que ocurre con la EMR (119,120). Si bien esta diferencia podría ser explicada en parte porque el análisis del quimerismo en MO no se realiza hasta el día +30, se puede observar que tanto en el día +30 como en el día +60 y en el día +90 la IA de QC en SP es mayor que en MO. Estos resultados ya han sido publicados por otros grupos (121,122), si bien en ninguno de los trabajos previos se ha descrito de forma comparativa la cinética de adquisición de QC en estos compartimentos. Esto podría explicarse por ser la MO el lugar de hematopoyesis de las células tumorales (las cuales permanezcan en forma de EMR), o bien porque las células hematopoyéticas sanas del receptor sean menos sensibles a la acción de la quimioterapia de acondicionamiento y persista cierta hematopoyesis residual que gradualmente va disminuyendo.

Por otra parte, nuestro estudio es el primero que describe la **adquisición de QC en CD34+**. Resulta, por tanto, especialmente interesante conocer que la dinámica del quimerismo en CD34+ es muy similar a la de MO total. Hay pocos trabajos publicados que analicen el valor del quimerismo en esta subpoblación, especialmente en etapas tempranas postrasplante, pues todos ellos están enfocados a la detección precoz de la recaída, sin que se haga un análisis descriptivo de su valor en el prendimiento (64,66,123,124).

Tanto en el quimerismo en MO como en CD34+ los pacientes con **TPH haploidéntico** presentaron una adquisición más precoz. Como se ha explicado previamente, esto podría relacionarse con la disparidad HLA o por las diferencias en la profilaxis de EICR.

Además de la modalidad de TPH, en este y otros estudios se han encontrado otras variables inherentes al paciente, a la enfermedad de base, o a las características del TPH que pueden influir en la dinámica de adquisición de QC.

En cuanto a la **edad**, en nuestra cohorte los pacientes con **edad por encima de la mediana** (44,9 años) presentaban una **IA de QC en MO y LT más tardía** ($p<0,01$; $p=0,14$). El único estudio en la literatura que describe una relación entre quimerismo y edad en pacientes adultos es el de Panse *et al.* (41), en el cual se analizaron 125 pacientes que recibieron TPHs no mieloablativos de donante HLA idéntico, si bien en este estudio la edad del receptor se correlacionaba fuertemente con la edad del donante. En nuestra cohorte, los resultados parecen estar relacionados con una mediana de edad más alta en los pacientes con **diagnóstico de SMD/SMP**, los cuales presentan claramente un QC más tardío.

En cuanto a la patología de base, en nuestra cohorte de pacientes, aquellos con diagnóstico de **MM presentaban un QC más precoz** en SP, LT y CM, mientras que los pacientes con **diagnóstico de linfoma presentaban un QC más precoz** sólo en LT y los pacientes con diagnóstico de **SMD/SMP presentaban una adquisición de QC más tardía** en LT y en MO. Existen varios estudios en la literatura que demuestran que hay un QC más precoz en LT (34,35) y en SP (33) en pacientes con linfoma frente a SMD/SMP, lo cual se reproduce también en nuestros pacientes. En los pacientes con diagnóstico de linfoma o MM parece que la adquisición tan precoz de QC probablemente se relacione con la profunda linfodepleción previa al TPH. Ésta se debe a que se trata de pacientes altamente pretratados,

incluyendo normalmente un TPH autólogo previo, ya que el alo-TPH normalmente se plantea a partir de la tercera línea de tratamiento. Por otra parte, los pacientes con patologías de tipo SMD/SMP frecuentemente reciben un alo-TPH sin recibir ningún tipo de tratamiento intensivo y en esta población no está indicada la realización de un TPH autólogo. Como cabría esperar debido a la ausencia de tratamientos intensivos previos, en estos pacientes se observa un QC más tardío en los LT. Sin embargo, en los SMD/SMP también se encuentra un QC más tardío en MO. En este caso se podría suponer que hubiera otros factores dependientes del nicho y del microambiente medular (como ejemplo más claro se podría poner la mielofibrosis), por los que las células del donante tuvieran más dificultades para injertar y la hematopoyesis residual del receptor perdurara durante un periodo más largo. Además, también se observó que, comparando los pacientes con diagnóstico de leucemia aguda, aquellos con **LLA adquirían más precozmente QC en LT**. Estos resultados se pueden explicar en parte por la diferencia de intensidad en los acondicionamientos recibidos, y más concretamente al empleo de ICT como parte del acondicionamiento en las LLA. Esto también se podría explicar por los tratamientos recibidos previamente, ya que es más frecuente que los pacientes con diagnóstico de LMA reciban el TPH en 1ª RC, mientras que las LLA con frecuencia lo reciben en 2ª RC. De hecho, la mediana de líneas de tratamiento previas en nuestra serie fue de 1 para las LMA y de 2 para las LLA.

En relación al tratamiento previo al TPH, en nuestros pacientes encontramos una relación entre la **adquisición precoz de QC en LT** y haber recibido **dos o más líneas de QT** o un **TPH autólogo previo al alo-TPH**. Estos resultados son similares a los reportados previamente por otros grupos (32,34,36,37). Como se ha ido desarrollando en los párrafos previos, es probable que este aspecto tenga una relación con la inmunosupresión profunda que se produce en los pacientes que reciben múltiples líneas de tratamiento quimioterápico, y que disminuiría las fuerzas inmunes en sentido receptor-donante. Por otra parte, es posible que también se relacione con factores inherentes al nicho hematopoyético en enfermedades en las que es bien conocido que el prendimiento es más dificultoso y que frecuentemente no tienen indicación de tratamiento previo con QT, siendo la mielofibrosis el paradigma en este aspecto.

En nuestra cohorte de pacientes, se observó un QC más precoz en LT en los pacientes que recibían **AIR frente a los que recibían AMA**. En otros estudios, el empleo de ICT (35,38,39) o de melfalán (37,40) parecen favorecer la adquisición de QC. En este trabajo, los pacientes con diagnóstico de linfoma o de MM recibieron siempre AIR, lo que podría actuar como un factor de confusión. De hecho, la intensidad del acondicionamiento no mantuvo la significación en el análisis multivariable.

Con respecto al producto infundido, en la mayoría de los pacientes de nuestra serie se empleó como fuente de PH la SP, y sólo se encontraron diferencias en la adquisición de QC en CM al comparar **la SP con la SCU, con un QC más precoz** al emplear la SP. Esto está en probable relación con el prendimiento de cada tipo de fuente, tal y como se explica en el apartado anterior. Por otro lado, si bien existen varios trabajos que encuentran relación entre la celularidad infundida y la adquisición de QC (32,34,36,41,42), no encontramos dicha relación en nuestros pacientes.

Es de especial interés el hallazgo de que los pacientes en **RC de su enfermedad de base previo al TPH presentaban mayor IA de QC en MO**. Este hallazgo se reproducía también en la cohorte de pacientes con diagnóstico solamente de LMA. Este dato no se había reportado en otros estudios hasta la fecha y probablemente se encuentre relacionado con la mayor persistencia de células malignas del receptor en aquellos pacientes con enfermedad visible antes del TPH. Es posible que se deba a que estas células resistentes a los tratamientos previos también sean resistentes a la QT del

acondicionamiento, y por tanto perduren en los momentos iniciales después de la realización del trasplante.

3.- Quimerismo y complicaciones postrasplante

g) Fracaso del injerto

En nuestra serie sólo hubo 5 pacientes con **fracaso primario** y 3 pacientes con **fracaso secundario del injerto**. Sin embargo, se observó una **menor proporción de pacientes en QC precoz** en todos los compartimentos celulares en comparación con el resto de pacientes. En el estudio dinámico del quimerismo, se encontró una **tendencia al descenso** en el porcentaje de ADN del donante en SP total y en LT en la mayoría de los casos. Además, se observó que un nivel de **LT del donante por debajo del 40 % es altamente sugestivo** de fracaso primario o secundario del injerto.

Esto se ha descrito en la literatura, puesto que hay artículos que correlacionan la persistencia de QM en fases precoces con el desarrollo de fracaso de injerto (125), y la mayoría de ellos presta especial atención a la dinámica descendente en pacientes con esta complicación (45,63,91,126).

Este punto entraña especial relevancia clínica, ya que el diagnóstico precoz de un fracaso primario o secundario del injerto permite la instauración rápida y el posible éxito de un tratamiento inmunomodulador, como la retirada de la inmunosupresión y las ILDs (53).

h) Quimerismo y EICR

Se observó una mayor incidencia de EICRa II-IV y III-IV en aquellos pacientes que habían sido sometidos a un **TPH de DNE** y presentaban QC en SP o LT entre el día +21-30. Por otro lado, aquellos pacientes sometidos a **TPH de DE y haploidéntico**, presentaron mayor EICRa grado III-IV cuando estaban en QM días +30 en SP o MO. Estos resultados contrastan con lo publicado en trabajos previos que, en líneas generales, encuentran mayor asociación del estatus de QC con el desarrollo de EICR, especialmente en LT (33–35,39,43,46,51,54–57,59).

En nuestra serie, en el caso de los pacientes con **TPH de DE** que presentaban QM en el día +30 se tomaron medidas muy activas en cuanto a descenso precoz de la inmunosupresión, especialmente en pacientes con enfermedades de alto riesgo de recaída (enfermedades neoplásicas trasplantados en situación distinta de primera RC con EMR negativa, o con sospecha/riesgo de fracaso de injerto). Esto hace que los pacientes en QM fueran sometidos a una disminución más agresiva de la inmunosupresión, forzando así el efecto inmune del donante, y llevando en muchos casos al desarrollo de EICR. Entre los pacientes con TPH de DE y QM en SP o en MO se descendió la inmunosupresión de forma precoz (antes de 2 meses) en el 25 % de los casos (n=6). Todos esos pacientes desarrollaron EICR, pero ninguno presentó recaída de su enfermedad de base ni falleció como consecuencia de EICR. Por este motivo, es posible que estos pacientes se beneficien de esta actitud terapéutica activa, que, si bien puede aumentar el riesgo de desarrollar EICR, también parece disminuir las posibilidades de presentar una recaída.

De los trabajos publicados en la literatura, el de Rupa-Matysek, *et al.* (58) podría ser interesante en nuestro ámbito, ya que no encuentra relación entre el estatus del quimerismo en un punto y el desarrollo de EICRa, pero sí con el incremento de células del donante. El aumento en un 5 % de LT del donante entre determinaciones se relacionaba con la presencia de EICRa. A este respecto, es importante incidir en la importancia del empleo de una técnica con alta capacidad de cuantificación para garantizar la validez de estas observaciones. Este tipo de aproximación podría dar más información en centros con un manejo muy activo de la inmunosupresión, ya que relacionaría el desarrollo de EICR con la potenciación de las fuerzas inmunes del donante, podría demostrar la vinculación del EICT a la EICR, y no estaría influida por el manejo de la inmunosupresión como el análisis en un momento puntual.

En cuanto al **TPH haploidéntico**, en este subgrupo de pacientes, se redujo la inmunosupresión de forma precoz (antes de 3 meses) en 5/16 pacientes (31 %), de los cuales 2 desarrollaron EICR y otro de ellos recayó. De los 11 pacientes que no disminuyeron la inmunosupresión precozmente, 7 desarrollaron EICR y otro de ellos recayó. Sí llama la atención la incidencia de EICR mayor el grupo de pacientes en QM que en el grupo global (53 %, 9/17), y aunque los resultados son estadísticamente significativos, el número de pacientes es muy pequeño y se deben analizar los resultados en otras series más grandes para poder obtener conclusiones sólidas. Hasta la fecha, no hay estudios que describan la relación del estatus del quimerismo con el desarrollo de EICR en el TPH haploidéntico.

Respecto a la EICRc, no se encontró en este trabajo relación con la dinámica del quimerismo.

Por tanto, en el ámbito de la EICR, en este estudio no se pueden extraer conclusiones sólidas respecto a la relación con la adquisición de QC, probablemente determinada por la influencia del manejo activo de la inmunosupresión. Estos resultados sugieren la necesidad de poner en marcha un trabajo más amplio que estudie de forma más estrecha la dinámica en subpoblaciones T y su relación con los cambios en la inmunosupresión, la patología de base y la modalidad de TPH empleada, con especial hincapié en aquellos pacientes que reciben profilaxis de EICR con ciclofosfamida postrasplante, ya que ésta parece jugar un papel importante en la dinámica del quimerismo.

i) Quimerismo y recaída

En el estudio de la relación del quimerismo con la recaída, los trabajos más interesantes se han realizado de forma prospectiva con un seguimiento muy estrecho del estado del quimerismo y midiendo la dinámica del quimerismo, la cual es mucho más informativa que una determinación concreta en un punto del TPH (25–27,63,75).

En nuestro trabajo se encontró que el **QM en MO a día +30** se relacionaba con una mayor IA de recaída en el subgrupo de pacientes con TPH de DE. En la publicación de Horn *et al.* (127), se describe en una población pediátrica la aplicación de manejo precoz de la inmunosupresión y empleo de ILD en pacientes con QM precoz (entre los días +28 y +40) tanto en SP como en MO o en linajes leucocitarios, con mejoría de la supervivencia en los que se empleaba esta estrategia. Este trabajo justificaría el manejo muy activo de la inmunosupresión en los pacientes con enfermedad de alto riesgo que presenten QM en MO a día +30.

Por otra parte, en la línea de otros trabajos previos (64,66,123,124), se encontró que el **QM en CD34+ de MO a día +30** se relacionaba con una mayor IA de recaída sólo en los pacientes con diagnóstico de LMA. Sin embargo, los estudios publicados previamente realizan seguimiento evolutivo del quimerismo en CD34+, y ninguno de ellos analiza el valor del mismo en un punto concreto postrasplante. De ellos, dos realizan seguimiento en CD34+ purificadas a partir de MO al igual que nuestro centro (66,123). Sin embargo, la experiencia del grupo de Bornhäuser (64) es que el quimerismo en CD34+ separadas a partir de SP parece ser más sensible comparativamente que el de MO, si bien no existen otros estudios que confirmen esta observación. Por tanto, el quimerismo en CD34+ está relativamente poco explorado, no está claro si se puede realizar el seguimiento en CD34+ purificadas de SP y tampoco la periodicidad con la que se debería realizar. Resulta por tanto interesante el hallazgo de que el estatus del quimerismo en CD34+ obtenidas de MO a día +30 en pacientes con diagnóstico de LMA tiene valor pronóstico en cuanto a recaída, ya que podría orientar un subgrupo de pacientes a los que habría que realizarles un seguimiento más estrecho, e incluso una retirada precoz de la inmunosupresión si no hubiera contraindicación, o el empleo de estrategias terapéuticas como la infusión de linfocitos del donante.

En cuanto al seguimiento del **linaje leucémico en patologías distintas a la LMA**, algunos grupos han demostrado buena experiencia con seguimiento de CD19+ (67) y CD34+ en LLA-B (68), o según inmunofenotipo específico en LLA-B (69) y en neoplasias mieloides (70). Sin embargo, dado que se trata de técnicas costosas, no estandarizadas, y que requieren de experiencia en el equipo que las realiza y en los clínicos que interpretan los resultados, no son pruebas que se realicen de rutina en la mayoría de los centros. Además, no debemos olvidar que tanto la LMA como la LLA suelen tener marcadores moleculares o de CMF para seguimiento de EMR, y ambas técnicas son muy sensibles en la detección de pequeñas cantidades de células tumorales.

La otra aproximación en cuanto al manejo del quimerismo y la recaída sería el seguimiento muy estrecho de la dinámica del quimerismo **en sangre periférica**, si bien es verdad que implica aumentar el número de visitas hospitalarias, en los primeros meses la realización de la técnica semanalmente a todos los pacientes y una gran agilidad en el análisis de los datos y la emisión de resultados para poder tomar medidas terapéuticas precoces. Si se suman todos estos factores, hay múltiples estudios que han demostrado beneficio derivado de este tipo de manejo (25–27,57,63,65,75,81–83).

Más recientemente y en esta línea de investigación, se han publicado algunas aproximaciones que analizan el papel de **técnicas ultrasensibles basadas en qPCR** que permitirían detectar cantidades muy pequeñas de ADN de receptor que reaparecieran en un contexto de QC previo, a modo de seguimiento de EMR (128,129). No obstante, es importante aprender a interpretar los resultados de este tipo de técnicas, ya que se sigue detectando ADN del receptor en la mayoría hasta varios meses después del trasplante (130), e incluso algunos pacientes no llegan a alcanzar QC sin que ello se asocie con un mayor riesgo de recaída. Esto constituye un problema metodológico, ya que en estos pacientes en QM por qPCR no hay una forma fiable de determinar si el ADN residual del receptor corresponde a células tumorales, a células hematopoyéticas, o incluso a células del estroma medular o epiteliales que contaminen el material en el momento de la punción. En el futuro habrá que observar si la separación de linajes leucémicos podría presentar una mayor sensibilidad que la qPCR en la detección de EMR.

En este campo, nuestro grupo ha realizado un estudio comparativo entre la PCR-STR convencional y la qPCR basada en indels, demostrando una excelente correlación entre ambas técnicas, con una mayor sensibilidad para la qPCR, pero con una mejor capacidad de cuantificación para la PCR-STR con porcentajes de ADN de receptor superiores al 50 % (131). Nuestra experiencia con las técnicas basadas en qPCR es que se sigue detectando ADN del receptor durante mucho tiempo en la mayoría de pacientes, en cantidades muy bajas y con estudios de EMR persistentemente negativos, similar a lo descrito en otros trabajos (130).

j) Quimerismo y supervivencia

Existen algunos trabajos publicados que relacionan el estado de QC en distintos compartimentos con una mejor SG de los pacientes. En los estudios de Imahashi y Lamba (40,61), el estado de QC se asociaba con una mejor SG a expensas de menor recaída, sin diferencias en la MRT. Sin embargo, en el estudio de Saito *et al.* (32), el tener más de 60 % de LT del donante a día +30 se asoció con una mejor SG sin que se encontrara relación del estatus del quimerismo con la EICR, la MRT y la recaída.

De forma similar, en nuestra serie, se encontró que la **adquisición de QC en los distintos linajes (SP+30, LT+30 y MO+30) tenía un impacto en la SG**, siendo de especial relevancia en los pacientes con TPH de DE y DNE. Los pacientes que recibieron TPH haploidéntico seguían una tendencia similar, sin resultados estadísticamente significativos, probablemente por la adquisición de QC de forma mucho más precoz en todos los pacientes y en todos los compartimentos celulares en comparación con otros tipos de donante. En el TPH de SCU, por el contrario, no se encontró ningún impacto de la adquisición de QC en la SG, probablemente por el escaso número de pacientes y la mayor MRT. Dado que este aumento de SG no parece estar explicado por un menor riesgo de recaída entre los pacientes en QC (al menos en cuanto a la SP y los LT se refiere), probablemente sea una coalición de varios factores la que explique esta situación. Si la mejoría de supervivencia no se explica únicamente por el menor número de muertes secundarias a recaída, es lógico pensar que ésta se vea influida por una disminución en la MRT. De este modo, podríamos argumentar que es probable que los pacientes en QC tengan una mejor evolución debida a una menor tasa de fracaso del injerto, de recaída, de manipulación de la inmunosupresión con desarrollo de EICR y una mejor reconstitución inmune (y por tanto menos desarrollo de complicaciones infecciosas). Todos estos factores, aunque por separado no sean capaces de traducir una diferencia estadísticamente significativa, al ser analizados en global se asocian con una mejoría en la supervivencia.

En resumen, basándonos en los resultados de este trabajo, consideramos que resulta relevante la monitorización estrecha del **quimerismo en SP y LT** durante las **primeras semanas postrasplante** (desde el día +15 y de forma semanal hasta adquisición de QC) para monitorizar el prendimiento. Un QM en LT con un porcentaje de ADN del donante igual o inferior al 40 % debe hacer sospechar un fracaso del injerto. En cuanto al análisis del quimerismo en CM, éste probablemente pueda ser sustituido por el análisis en SP total a lo largo de todo el postrasplante, dado que no aporta información frente al estudio en SP total. Cabe incidir en la importancia del tiempo de respuesta del laboratorio y el contacto estrecho con los clínicos para que se puedan tomar decisiones precoces de inmunomodulación basadas en estos resultados, especialmente en pacientes con patologías con mal seguimiento por otras técnicas, como por ejemplo los SMD.

Por otra parte, el estudio del quimerismo **en MO a día +30** resulta especialmente importante para identificar un subgrupo de pacientes con alto riesgo de recaída que podría beneficiarse de un seguimiento más estrecho de EMR, o en caso de no disponer de marcador adecuado, de quimerismo (como planteó el grupo del Dr. Bader en Tübingen (21)). Además, el **quimerismo en células CD34+ obtenidas de MO** en los pacientes con diagnóstico de LMA ha demostrado valor en la anticipación de la recaída, debiendo considerarse los pacientes con QM a día +30 en esta subpoblación como un subgrupo de muy alto riesgo que precisaría intervención precoz con estrategias de inmunomodulación. De cara al seguimiento del quimerismo a largo plazo, y de forma especial en pacientes que no dispongan de marcadores de seguimiento de EMR, debería plantearse la implementación de **técnicas ultrasensibles** para cuantificación del quimerismo (por ejemplo, qPCR), para poder plantear estrategias precoces de manejo de la recaída.

En este trabajo **no se encontró una relación clara entre el quimerismo y la EICR**, si bien se realizó un manejo muy activo de la inmunosupresión en los pacientes en QM, con la consecuente influencia sobre los resultados. Por último, se ha mostrado una relación entre la **adquisición precoz de QC y la supervivencia**, probablemente en el contexto de una reducción global de las complicaciones en estos pacientes.

Conclusiones

- 1) Los **factores clínicos que influyen** en la adquisición de quimerismo completo son la edad al trasplante, la enfermedad de base, el tratamiento quimioterápico recibido previamente, el tipo de donante y la situación de la enfermedad al trasplante.
- 2) La adquisición de **quimerismo completo** se produce de una forma **más precoz** en las células mieloides, las células NK y los linfocitos B que en la sangre periférica total y en los linfocitos T. Por otra parte, es más temprana en la sangre periférica que en la médula ósea y en las células CD34+ de médula ósea.
- 3) El análisis del quimerismo en sangre periférica y en linfocitos T es de gran utilidad en el diagnóstico del **fracaso primario o secundario del injerto**. Pacientes con porcentaje de ADN del donante en linfocitos T igual o inferior al 40 % en las etapas iniciales del post-trasplante tienen una alta probabilidad de sufrir esta complicación.
- 4) El estudio del quimerismo en las **células mieloides** (CD15+/CD33+) resulta **poco informativo** y se puede sustituir por el análisis en la sangre periférica total.
- 5) Los pacientes que reciben un **trasplante haploidéntico**, presentan una adquisición de quimerismo completo **más precoz** en todas las subpoblaciones celulares en comparación con los que se trasplantan con otros tipos de donante. Este hecho podría estar relacionado con la propia disparidad HLA o con el empleo de ciclofosfamida postrasplante, si bien se precisan más estudios para confirmar este hallazgo y aclarar su etiología.
- 6) **No se encontró relación** entre el estatus del quimerismo y el desarrollo de **enfermedad injerto contra receptor** aguda ni crónica. Sin embargo, dado que el resultado del quimerismo sirvió para guiar el tratamiento inmunosupresor, no se pueden obtener conclusiones robustas de este hallazgo.
- 7) El estado de **quimerismo mixto en la médula ósea en el día +30** en los pacientes con trasplante de **donante emparentado HLA idéntico** se relaciona con una mayor incidencia de **recaída**.
- 8) El estado de **quimerismo mixto en las células CD34+** obtenidas de médula ósea entre los días +21 y +30 se relaciona con una mayor incidencia de **recaída** en los pacientes con diagnóstico de **leucemia aguda mieloblástica**. Por tanto, en este subgrupo de pacientes, sería recomendable realizar dicho estudio de forma rutinaria.
- 9) La **adquisición precoz** (antes de 30 días) de **quimerismo completo** en sangre periférica total, linfocitos T y médula ósea total se relaciona con una **mejor supervivencia global**, especialmente en los pacientes que reciben trasplante de donante HLA idéntico emparentado o no emparentado.

Referencias

1. Copelan EA. Hematopoietic stem-cell transplantation. *N Engl J Med*. 2006 Apr 27;354(17):1813–26.
2. Baron F, Storb R, Little M-T. Hematopoietic cell transplantation: five decades of progress. *Arch Med Res*. 2003 Dec;34(6):528–44.
3. Jacobson LO, Simmons EL, Marks EK, Eldredge JH. Recovery from radiation injury. *Science*. 1951 May 4;113(2940):510–1.
4. Lorenz E, Uphoff D, Reid TR, Shelton E. Modification of irradiation injury in mice and guinea pigs by bone marrow injections. *J Natl Cancer Inst*. 1951 Aug;12(1):197–201.
5. Thomas ED, Lochte HL, Lu WC, Ferrebee JW. Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. *N Engl J Med*. 1957 Sep 12;257(11):491–6.
6. Bortin MM. A compendium of reported human bone marrow transplants. *Transplantation*. 1970 Jun;9(6):571–87.
7. Appelbaum FR. Hematopoietic-cell transplantation at 50. *N Engl J Med*. 2007 Oct 11;357(15):1472–5.
8. Thomas E, Storb R, Clift RA, Fefer A, Johnson FL, Neiman PE, et al. Bone-marrow transplantation (first of two parts). *N Engl J Med*. 1975 Apr 17;292(16):832–43.
9. Thomas ED, Storb R, Clift RA, Fefer A, Johnson L, Neiman PE, et al. Bone-marrow transplantation (second of two parts). *N Engl J Med*. 1975 Apr 24;292(17):895–902.
10. Thomas ED, Buckner CD, Banaji M, Clift RA, Fefer A, Flournoy N, et al. One hundred patients with acute leukemia treated by chemotherapy, total body irradiation, and allogeneic marrow transplantation. *Blood*. 1977 Apr;49(4):511–33.
11. E. Donnall Thomas - Biographical [Internet]. [cited 2017 May 8]. Available from: https://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1990/thomas-bio.html
12. Apperley, Jane, Carreras, Enric, Gluckman, Eliane, Masszi, Tamas, editors. The EBMT Handbook [Internet]. 6th Edition. Forum Service s.r.l; 2012. Available from: <https://ebmtonline.forumservice.net/>
13. EBMT Annual Report 2018 [Internet]. [cited 2019 Jul 9]. Available from: <https://www.ebmt.org/registry/transplant-activity-survey>
14. Memoria anual de trasplante hematopoyético 2017 - ONT [Internet]. [cited 2019 Jul 9]. Available from: <http://www.ont.es/infesp/Memorias/Memoria%20TPH%202017v2%20con%20terapia%20celular.pdf>

15. Canaani J, Beohou E, Labopin M, Ghavamzadeh A, Beelen D, Hamladji R-M, et al. Trends in patient outcome over the past two decades following allogeneic stem cell transplantation for acute myeloid leukaemia: an ALWP/EBMT analysis. *J Intern Med*. 2018 Oct 29;
16. Enric Carreras, Montserrat Rovira, Izaskun Zebeiro, David Valcárcel. *Manual de Trasplante Hematopoyético*. 5ª. Molins de Rei: Antares; 2016.
17. Anderson D, Billingham R, Lampkin G, Medawar P. The use of skin grafting to distinguish between monzygotic and dizygotic twins in cattle. *Heredity*. 1951;5:379–97.
18. Ford C, Hamerton J, Barnes D, Loutit J. Cytological identification of radiation-chimaeras. *Nature*. 1956 Mar 10;177(4506):452–4.
19. Alcoceba M, Martínez-Laperche C, Buces E, Corral R, Buño I. Seguimiento genético del trasplante hematopoyético alogénico. In: *Genética Hematológica Manual Práctico*. 1ª. 2016.
20. Thiede C. Diagnostic chimerism analysis after allogeneic stem cell transplantation: new methods and markers. *Am J Pharmacogenomics Genomics-Relat Res Drug Dev Clin Pract*. 2004;4(3):177–87.
21. Bader P, Niethammer D, Willasch A, Kreyenberg H, Klingebiel T. How and when should we monitor chimerism after allogeneic stem cell transplantation? *Bone Marrow Transplant*. 2005 Jan;35(2):107–19.
22. Lion T, Watzinger F, Preuner S, Kreyenberg H, Tilanus M, de Weger R, et al. The EuroChimerism concept for a standardized approach to chimerism analysis after allogeneic stem cell transplantation. *Leukemia*. 2012 Aug;26(8):1821–8.
23. Clark JR, Scott SD, Jack AL, Lee H, Mason J, Carter GI, et al. Monitoring of chimerism following allogeneic haematopoietic stem cell transplantation (HSCT): technical recommendations for the use of short tandem repeat (STR) based techniques, on behalf of the United Kingdom National External Quality Assessment Service for Leucocyte Immunophenotyping Chimerism Working Group. *Br J Haematol*. 2015 Jan;168(1):26–37.
24. McCann SR, Lawler M. Mixed chimaerism; detection and significance following BMT. *Bone Marrow Transplant*. 1993 Feb;11(2):91–4.
25. Bader P, Kreyenberg H, Hoelle W, Dueckers G, Handgretinger R, Lang P, et al. Increasing mixed chimerism is an important prognostic factor for unfavorable outcome in children with acute lymphoblastic leukemia after allogeneic stem-cell transplantation: possible role for pre-emptive immunotherapy? *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2004 May 1;22(9):1696–705.
26. Bader P, Kreyenberg H, Hoelle W, Dueckers G, Kremens B, Dilloo D, et al. Increasing mixed chimerism defines a high-risk group of childhood acute myelogenous leukemia patients after allogeneic stem cell transplantation where pre-emptive immunotherapy may be effective. *Bone Marrow Transplant*. 2004 Apr;33(8):815–21.
27. Bader P, Klingebiel T, Schaudt A, Theurer-Mainka U, Handgretinger R, Lang P, et al. Prevention of relapse in pediatric patients with acute leukemias and MDS after allogeneic SCT by early immunotherapy initiated on the basis of increasing mixed chimerism: a single center experience of 12 children. *Leukemia*. 1999 Dec;13(12):2079–86.

28. Gaudernack, G., Leivestad, T., Ugelstad, J., Thorsby, E. Isolation of pure functionally active CD8+ T cells. Positive selection with monoclonal antibodies directly conjugated to monosized magnetic microspheres. *J Immunol Methods*. 1986 Jun 24;90(2):179–87.
29. Mackinnon, S., Barnett, L., Bourhis, JH., Black, P., Heller, G., O'Reilly, RJ. Myeloid and lymphoid chimerism after T-cell-depleted bone marrow transplantation: evaluation of conditioning regimens using the polymerase chain reaction to amplify human minisatellite regions of genomic DNA. *Blood*. 1992 Dec 15;80(12):3235–41.
30. Mackinnon S, Barnett L, Heller G, O'Reilly RJ. Minimal residual disease is more common in patients who have mixed T-cell chimerism after bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia. *Blood*. 1994 Jun 1;83(11):3409–16.
31. Antin JH, Childs R, Filipovich AH, Giralt S, Mackinnon S, Spitzer T, et al. Establishment of complete and mixed donor chimerism after allogeneic lymphohematopoietic transplantation: recommendations from a workshop at the 2001 Tandem Meetings of the International Bone Marrow Transplant Registry and the American Society of Blood and Marrow Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant*. 2001;7(9):473–85.
32. Saito B, Fukuda T, Yokoyama H, Kurosawa S, Takahashi T, Fuji S, et al. Impact of T cell chimerism on clinical outcome in 117 patients who underwent allogeneic stem cell transplantation with a busulfan-containing reduced-intensity conditioning regimen. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant*. 2008 Oct;14(10):1148–55.
33. Mickelson DM, Sproat L, Dean R, Sobecks R, Rybicki L, Kalaycio M, et al. Comparison of donor chimerism following myeloablative and nonmyeloablative allogeneic hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant*. 2011 Jan;46(1):84–9.
34. Baron F, Baker JE, Storb R, Gooley TA, Sandmaier BM, Maris MB, et al. Kinetics of engraftment in patients with hematologic malignancies given allogeneic hematopoietic cell transplantation after nonmyeloablative conditioning. *Blood*. 2004 Oct 15;104(8):2254–62.
35. Mohty M, Avinens O, Faucher C, Viens P, Blaise D, Eliaou J-F. Predictive factors and impact of full donor T-cell chimerism after reduced intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation. *Haematologica*. 2007 Jul;92(7):1004–6.
36. Carvallo C, Geller N, Kurlander R, Srinivasan R, Mena O, Igarashi T, et al. Prior chemotherapy and allograft CD34+ dose impact donor engraftment following nonmyeloablative allogeneic stem cell transplantation in patients with solid tumors. *Blood*. 2004 Feb 15;103(4):1560–3.
37. Valcárcel D, Martino R, Caballero D, Mateos MV, Pérez-Simón JA, Canals C, et al. Chimerism analysis following allogeneic peripheral blood stem cell transplantation with reduced-intensity conditioning. *Bone Marrow Transplant*. 2003 Mar;31(5):387–92.
38. Mattsson J, Uzunel M, Remberger M, Hassan M. Fractionated TBI correlates with less T cell mixed chimerism but increased risk of relapse compared to busulphan in patients with haematological malignancies after allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2003 Sep;32(5):477–83.
39. Miura Y, Tanaka J, Toubai T, Tsutsumi Y, Kato N, Hirate D, et al. Analysis of donor-type chimerism in lineage-specific cell populations after allogeneic myeloablative and non-myeloablative stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2006 May;37(9):837–43.

40. Imahashi N, Ohashi H, Terakura S, Miyao K, Sakemura R, Kato T, et al. Chimerism status after unrelated donor bone marrow transplantation with fludarabine-melphalan conditioning is affected by the melphalan dose and is predictive of relapse. *Ann Hematol.* 2015 Jul;94(7):1139–48.
41. Panse JP, Heimfeld S, Guthrie KA, Maris MB, Maloney DG, Baril BB, et al. Allogeneic peripheral blood stem cell graft composition affects early T-cell chimaerism and later clinical outcomes after non-myeloablative conditioning. *Br J Haematol.* 2005 Mar;128(5):659–67.
42. Roux E, Helg C, Dumont-Girard F, Chapuis B, Jeannet M, Roosnek E. Analysis of T-cell repopulation after allogeneic bone marrow transplantation: significant differences between recipients of T-cell depleted and unmanipulated grafts. *Blood.* 1996 May 1;87(9):3984–92.
43. Elkaim E, Picard C, Galambrun C, Barlogis V, Loundou A, Curtillet C, et al. Peripheral blood cells chimerism after unrelated cord blood transplantation in children: kinetics, predictive factors and impact on post-transplant outcome. *Br J Haematol.* 2014 Aug;166(4):557–65.
44. Boeck S, Hamann M, Pihusch V, Heller T, Diem H, Rolf B, et al. Kinetics of dendritic cell chimerism and T cell chimerism in allogeneic hematopoietic stem cell recipients. *Bone Marrow Transplant.* 2006 Jan;37(1):57–64.
45. Dubovsky J, Daxberger H, Fritsch G, Printz D, Peters C, Matthes S, et al. Kinetics of chimerism during the early post-transplant period in pediatric patients with malignant and non-malignant hematologic disorders: implications for timely detection of engraftment, graft failure and rejection. *Leukemia.* 1999 Dec;13(12):2059, 2060–9.
46. Childs R, Clave E, Contentin N, Jayasekera D, Hensel N, Leitman S, et al. Engraftment kinetics after nonmyeloablative allogeneic peripheral blood stem cell transplantation: full donor T-cell chimerism precedes alloimmune responses. *Blood.* 1999 Nov 1;94(9):3234–41.
47. Mattsson J, Uzunel M, Brune M, Hentschke P, Barkholt L, Stierner U, et al. Mixed chimaerism is common at the time of acute graft-versus-host disease and disease response in patients receiving non-myeloablative conditioning and allogeneic stem cell transplantation. *Br J Haematol.* 2001 Dec;115(4):935–44.
48. Matthes-Martin S, Lion T, Haas OA, Frommlet F, Daxberger H, König M, et al. Lineage-specific chimaerism after stem cell transplantation in children following reduced intensity conditioning: potential predictive value of NK cell chimaerism for late graft rejection. *Leukemia.* 2003 Oct;17(10):1934–42.
49. Breuer S, Preuner S, Fritsch G, Daxberger H, Koenig M, Poetschger U, et al. Early recipient chimerism testing in the T- and NK-cell lineages for risk assessment of graft rejection in pediatric patients undergoing allogeneic stem cell transplantation. *Leukemia.* 2012 Mar;26(3):509–19.
50. Kwon M, Martínez-Laperche C, Balsalobre P, Serrano D, Anguita J, Gayoso J, et al. Early peripheral blood and T-cell chimerism dynamics after umbilical cord blood transplantation supported with haploidentical cells. *Bone Marrow Transplant.* 2014 Feb;49(2):212–8.
51. McSweeney PA, Niederwieser D, Shizuru JA, Sandmaier BM, Molina AJ, Maloney DG, et al. Hematopoietic cell transplantation in older patients with hematologic malignancies: replacing high-dose cytotoxic therapy with graft-versus-tumor effects. *Blood.* 2001 Jun 1;97(11):3390–400.

52. Bornhäuser M, Thiede C, Platzbecker U, Jenke A, Helwig A, Plettig R, et al. Dose-reduced conditioning and allogeneic hematopoietic stem cell transplantation from unrelated donors in 42 patients. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2001 Aug;7(8):2254–62.
53. Díez-Martín JL, Gómez-Pineda A, Serrano D, Carrión R, Balsalobre P, Buño I. Successful treatment of incipient graft rejection with donor leukocyte infusions, further proof of a graft versus host lymphohaemopoietic effect. *Bone Marrow Transplant*. 2004 May;33(10):1037–41.
54. Mattsson J, Uzunel M, Remberger M, Ringdén O. T cell mixed chimerism is significantly correlated to a decreased risk of acute graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation. *Transplantation*. 2001 Feb 15;71(3):433–9.
55. Bertheas MF, Lafage M, Levy P, Blaise D, Stoppa AM, Viens P, et al. Influence of mixed chimerism on the results of allogeneic bone marrow transplantation for leukemia. *Blood*. 1991 Dec 1;78(11):3103–6.
56. Thompson PA, Stingo F, Keating MJ, Wierda WG, O'Brien SM, Estrov Z, et al. Long-term follow-up of patients receiving allogeneic stem cell transplant for chronic lymphocytic leukaemia: mixed T-cell chimerism is associated with high relapse risk and inferior survival. *Br J Haematol*. 2017 May 1;177(4):567–77.
57. van Besien K, Dew A, Lin S, Joseph L, Godley LA, Larson RA, et al. Patterns and kinetics of T-cell chimerism after allo transplant with alemtuzumab-based conditioning: mixed chimerism protects from GVHD, but does not portend disease recurrence. *Leuk Lymphoma*. 2009 Nov;50(11):1809–17.
58. Rupa-Matysek J, Lewandowski K, Nowak W, Sawiński K, Gil L, Komarnicki M. Correlation between the kinetics of CD3+ chimerism and the incidence of graft-versus-host disease in patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Transplant Proc*. 2011 Jun;43(5):1915–23.
59. Jiang Y, Wan L, Qin Y, Wang X, Yan S, Xie K, et al. Chimerism status is correlated to acute graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation. *Int J Hematol*. 2014 Mar;99(3):323–8.
60. Martínez-Laperche C, Noriega V, Kwon M, Balsalobre P, González-Rivera M, Serrano D, et al. Achievement of early complete donor chimerism in CD25+ activated leukocytes is a strong predictor of the development of graft-versus-host-disease after stem cell transplantation. *Exp Hematol*. 2015 Jan;43(1):4-13.e1.
61. Lamba R, Abella E, Kukuruga D, Klein J, Savasan S, Abidi MH, et al. Mixed hematopoietic chimerism at day 90 following allogeneic myeloablative stem cell transplantation is a predictor of relapse and survival. *Leukemia*. 2004 Oct;18(10):1681–6.
62. Suttorp M, Schmitz N, Dreger P, Schaub J, Löffler H. Monitoring of chimerism after allogeneic bone marrow transplantation with unmanipulated marrow by use of DNA polymorphisms. *Leukemia*. 1993 May;7(5):679–87.
63. Bader P, Hölle W, Klingebiel T, Handgretinger R, Benda N, Schlegel PG, et al. Mixed hematopoietic chimerism after allogeneic bone marrow transplantation: the impact of quantitative PCR analysis for prediction of relapse and graft rejection in children. *Bone Marrow Transplant*. 1997 Apr;19(7):697–702.

64. Bornhäuser M, Oelschlaegel U, Platzbecker U, Bug G, Lutterbeck K, Kiehl MG, et al. Monitoring of donor chimerism in sorted CD34+ peripheral blood cells allows the sensitive detection of imminent relapse after allogeneic stem cell transplantation. *Haematologica*. 2009 Nov;94(11):1613–7.
65. Zeiser R, Spyridonidis A, Wäsch R, Ihorst G, Grüllich C, Bertz H, et al. Evaluation of immunomodulatory treatment based on conventional and lineage-specific chimerism analysis in patients with myeloid malignancies after myeloablative allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Leukemia*. 2005 May;19(5):814–21.
66. Lange T, Hubmann M, Burkhardt R, Franke G-N, Cross M, Scholz M, et al. Monitoring of WT1 expression in PB and CD34(+) donor chimerism of BM predicts early relapse in AML and MDS patients after hematopoietic cell transplantation with reduced-intensity conditioning. *Leukemia*. 2011 Mar;25(3):498–505.
67. Jiang Y, Wan L, Qin Y, Wang X, Yan S, Xie K, et al. Donor Chimerism of B Cells and Nature Killer Cells Provides Useful Information to Predict Hematologic Relapse following Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *PloS One*. 2015;10(7):e0133671.
68. Preuner S, Peters C, Pötschger U, Daxberger H, Fritsch G, Geyeregger R, et al. Risk assessment of relapse by lineage-specific monitoring of chimerism in children undergoing allogeneic stem cell transplantation for acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 2016 Jun;101(6):741–6.
69. Zetterquist H, Mattsson J, Uzunel M, Näsman-Björk I, Svenberg P, Tammik L, et al. Mixed chimerism in the B cell lineage is a rapid and sensitive indicator of minimal residual disease in bone marrow transplant recipients with pre-B cell acute lymphoblastic leukemia. *Bone Marrow Transplant*. 2000 Apr;25(8):843–51.
70. Mattsson J, Uzunel M, Tammik L, Aschan J, Ringdén O. Leukemia lineage-specific chimerism analysis is a sensitive predictor of relapse in patients with acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome after allogeneic stem cell transplantation. *Leukemia*. 2001 Dec;15(12):1976–85.
71. Petz LD, Yam P, Wallace RB, Stock AD, de Lange G, Knowlton RG, et al. Mixed hematopoietic chimerism following bone marrow transplantation for hematologic malignancies. *Blood*. 1987 Nov;70(5):1331–7.
72. Roux E, Helg C, Chapius B, Jeannet M, Roosnek E. Mixed chimerism after bone marrow transplantation and the risk of relapse. *Blood*. 1994 Dec 15;84(12):4385–6.
73. Huss R, Deeg HJ, Gooley T, Bryant E, Leisenring W, Clift R, et al. Effect of mixed chimerism on graft-versus-host disease, disease recurrence and survival after HLA-identical marrow transplantation for aplastic anemia or chronic myelogenous leukemia. *Bone Marrow Transplant*. 1996 Oct;18(4):767–76.
74. Lee HC, Saliba RM, Rondon G, Chen J, Charafeddine Y, Medeiros LJ, et al. Mixed T Lymphocyte Chimerism after Allogeneic Hematopoietic Transplantation Is Predictive for Relapse of Acute Myeloid Leukemia and Myelodysplastic Syndromes. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant*. 2015 Nov;21(11):1948–54.
75. Bader P, Beck J, Frey A, Schlegel PG, Hebarth H, Handgretinger R, et al. Serial and quantitative analysis of mixed hematopoietic chimerism by PCR in patients with acute leukemias allows the prediction of relapse after allogeneic BMT. *Bone Marrow Transplant*. 1998 Mar;21(5):487–95.

76. Collins RH, Shpilberg O, Drobyski WR, Porter DL, Giralto S, Champlin R, et al. Donor leukocyte infusions in 140 patients with relapsed malignancy after allogeneic bone marrow transplantation. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 1997 Feb;15(2):433–44.
77. Kolb HJ. Donor leukocyte transfusions for treatment of leukemic relapse after bone marrow transplantation. EBMT Immunology and Chronic Leukemia Working Parties. *Vox Sang*. 1998;74 Suppl 2:321–9.
78. Kolb HJ, Holler E. Adoptive immunotherapy with donor lymphocyte transfusions. *Curr Opin Oncol*. 1997 Mar;9(2):139–45.
79. Luznik L, Fuchs EJ. Donor lymphocyte infusions to treat hematologic malignancies in relapse after allogeneic blood or marrow transplantation. *Cancer Control J Moffitt Cancer Cent*. 2002 Apr;9(2):123–37.
80. Riddell SR, Murata M, Bryant S, Warren EH. T-cell therapy of leukemia. *Cancer Control J Moffitt Cancer Cent*. 2002 Apr;9(2):114–22.
81. Huisman C, de Weger RA, de Vries L, Tilanus MGJ, Verdonck LF. Chimerism analysis within 6 months of allogeneic stem cell transplantation predicts relapse in acute myeloid leukemia. *Bone Marrow Transplant*. 2007 Mar;39(5):285–91.
82. Román J, Serrano J, Jiménez A, Castillejo JA, Reina ML, González MG, et al. Myeloid mixed chimerism is associated with relapse in bcr-abl positive patients after unmanipulated allogeneic bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia. *Haematologica*. 2000 Feb;85(2):173–80.
83. Woehlecke C, Wittig S, Sanft J, Kreyenberg H, Gruhn B. Detection of relapse after hematopoietic stem cell transplantation in childhood by monitoring of WT1 expression and chimerism. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2015 Jul;141(7):1283–90.
84. Choi SJ, Lee KH, Lee JH, Kim S, Chung HJ, Lee JS, et al. Prognostic value of hematopoietic chimerism in patients with acute leukemia after allogeneic bone marrow transplantation: a prospective study. *Bone Marrow Transplant*. 2000 Aug;26(3):327–32.
85. Doney K, Loken M, Bryant E, Smith A, Appelbaum F. Lack of utility of chimerism studies obtained 2-3 months after myeloablative hematopoietic cell transplantation for ALL. *Bone Marrow Transplant*. 2008 Aug;42(4):271–4.
86. Pochon C, Oger E, Michel G, Dalle J-H, Salmon A, Nelken B, et al. Follow-up of post-transplant minimal residual disease and chimerism in childhood lymphoblastic leukaemia: 90 d to react. *Br J Haematol*. 2015 Apr;169(2):249–61.
87. McCann S, Passweg J, Bacigalupo A, Locasciulli A, Locatelli F, Ryan J, et al. The influence of cyclosporin alone, or cyclosporin and methotrexate, on the incidence of mixed haematopoietic chimaerism following allogeneic sibling bone marrow transplantation for severe aplastic anaemia. *Bone Marrow Transplant*. 2007 Jan;39(2):109–14.
88. Kristt D, Israeli M, Narinski R, Or H, Yaniv I, Stein J, et al. Hematopoietic chimerism monitoring based on STRs: quantitative platform performance on sequential samples. *J Biomol Tech JBT*. 2005 Dec;16(4):380–91.

89. Kristt D, Stein J, Yaniv I, Klein T. Assessing quantitative chimerism longitudinally: technical considerations, clinical applications and routine feasibility. *Bone Marrow Transplant*. 2007 Mar;39(5):255–68.
90. Thiede C, Florek M, Bornhäuser M, Ritter M, Mohr B, Brendel C, et al. Rapid quantification of mixed chimerism using multiplex amplification of short tandem repeat markers and fluorescence detection. *Bone Marrow Transplant*. 1999 May;23(10):1055–60.
91. Thiede C, Bornhäuser M, Oelschlägel U, Brendel C, Leo R, Daxberger H, et al. Sequential monitoring of chimerism and detection of minimal residual disease after allogeneic blood stem cell transplantation (BSCT) using multiplex PCR amplification of short tandem repeat-markers. *Leukemia*. 2001 Feb;15(2):293–302.
92. Willasch AM, Kreyenberg H, Shayegi N, Rettinger E, Meyer V, Zabel M, et al. Monitoring of hematopoietic chimerism after transplantation for pediatric myelodysplastic syndrome: real-time or conventional short tandem repeat PCR in peripheral blood or bone marrow? *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant*. 2014 Dec;20(12):1918–25.
93. Cheson BD, Bennett JM, Kopecky KJ, Büchner T, Willman CL, Estey EH, et al. Revised recommendations of the International Working Group for Diagnosis, Standardization of Response Criteria, Treatment Outcomes, and Reporting Standards for Therapeutic Trials in Acute Myeloid Leukemia. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2003 Dec 15;21(24):4642–9.
94. Gadner H, Masera G, Schrappe M, Eden T, Benoit Y, Harrison C, et al. The Eighth International Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Workshop ('Ponte di legno meeting') report: Vienna, Austria, April 27-28, 2005. *Leukemia*. 2006 Jan;20(1):9–17.
95. Cheson BD. Staging and response assessment in lymphomas: the new Lugano classification. *Chin Clin Oncol*. 2015 Mar;4(1):5.
96. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Döhner H, et al. Guidelines for diagnosis, indications for treatment, response assessment and supportive management of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2018 Mar 14;
97. Cheson BD, Bennett JM, Kantarjian H, Pinto A, Schiffer CA, Nimer SD, et al. Report of an international working group to standardize response criteria for myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2000 Dec 1;96(12):3671–4.
98. Savona MR, Malcovati L, Komrokji R, Tiu RV, Mughal TI, Orazi A, et al. An international consortium proposal of uniform response criteria for myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms (MDS/MPN) in adults. *Blood*. 2015 Mar 19;125(12):1857–65.
99. Baccarani M, Deininger MW, Rosti G, Hochhaus A, Soverini S, Apperley JF, et al. European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013. *Blood*. 2013 Aug 8;122(6):872–84.
100. Tefferi A, Cervantes F, Mesa R, Passamonti F, Verstovsek S, Vannucchi AM, et al. Revised response criteria for myelofibrosis: International Working Group-Myeloproliferative Neoplasms Research and Treatment (IWG-MRT) and European LeukemiaNet (ELN) consensus report. *Blood*. 2013 Aug 22;122(8):1395–8.

101. Kumar S, Paiva B, Anderson KC, Durie B, Landgren O, Moreau P, et al. International Myeloma Working Group consensus criteria for response and minimal residual disease assessment in multiple myeloma. *Lancet Oncol*. 2016;17(8):e328–46.
102. Camitta BM. What is the definition of cure for aplastic anemia? *Acta Haematol*. 2000;103(1):16–8.
103. Harris AC, Young R, Devine S, Hogan WJ, Ayuk F, Bunworasate U, et al. International, Multicenter Standardization of Acute Graft-versus-Host Disease Clinical Data Collection: A Report from the Mount Sinai Acute GVHD International Consortium. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant*. 2016 Jan;22(1):4–10.
104. Lee SJ, Wolff D, Kitko C, Koreth J, Inamoto Y, Jagasia M, et al. Measuring therapeutic response in chronic graft-versus-host disease. National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: IV. The 2014 Response Criteria Working Group report. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant*. 2015 Jun;21(6):984–99.
105. Sairafi D, Remberger M, Uhlin M, Ljungman P, Ringdén O, Mattsson J. Leukemia lineage-specific chimerism analysis and molecular monitoring improve outcome of donor lymphocyte infusions. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant*. 2010 Dec;16(12):1728–37.
106. Mehta RS, Rezvani K. Immune reconstitution post allogeneic transplant and the impact of immune recovery on the risk of infection. *Virulence*. 2016 16;7(8):901–16.
107. Ogonek J, Kralj Juric M, Ghimire S, Varanasi PR, Holler E, Greinix H, et al. Immune Reconstitution after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Front Immunol*. 2016;7:507.
108. Negrin RS. Graft-versus-host disease versus graft-versus-leukemia. *Hematol Am Soc Hematol Educ Program*. 2015;2015:225–30.
109. Chaudhry MS, Velardi E, Malard F, van den Brink MRM. Immune Reconstitution after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation: Time To T Up the Thymus. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2017 Jan 1;198(1):40–6.
110. Sarantopoulos S. Allogeneic Stem-Cell Transplantation - A T-Cell Balancing ACT. *N Engl J Med*. 2018 Feb 1;378(5):480–2.
111. Mottok A, Steidl C. Genomic alterations underlying immune privilege in malignant lymphomas. *Curr Opin Hematol*. 2015 Jul;22(4):343–54.
112. Gonzalez H, Hagerling C, Werb Z. Roles of the immune system in cancer: from tumor initiation to metastatic progression. *Genes Dev*. 2018 01;32(19–20):1267–84.
113. de Witte MA, Sarhan D, Davis Z, Felices M, Vallera DA, Hinderlie P, et al. Early Reconstitution of NK and $\gamma\delta$ T Cells and Its Implication for the Design of Post-Transplant Immunotherapy. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant*. 2018 Jun;24(6):1152–62.
114. Wang W-T, Zhu H-Y, Wu Y-J, Xia Y, Wu J-Z, Wu W, et al. Elevated absolute NK cell counts in peripheral blood predict good prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2018 Mar 1;144(3):449–57.

115. Auletta JJ, Devine SM, Waller EK. Plasmacytoid dendritic cells in allogeneic hematopoietic cell transplantation: benefit or burden? *Bone Marrow Transplant*. 2016 Mar;51(3):333–43.
116. Luznik L, O'Donnell PV, Symons HJ, Chen AR, Leffell MS, Zahurak M, et al. HLA-haploidentical bone marrow transplantation for hematologic malignancies using nonmyeloablative conditioning and high-dose, posttransplantation cyclophosphamide. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant*. 2008 Jun;14(6):641–50.
117. Luznik L, Jones RJ, Fuchs EJ. High-dose cyclophosphamide for graft-versus-host disease prevention. *Curr Opin Hematol*. 2010 Nov;17(6):493–9.
118. Ganguly S, Ross DB, Panoskaltsis-Mortari A, Kanakry CG, Blazar BR, Levy RB, et al. Donor CD4+ Foxp3+ regulatory T cells are necessary for posttransplantation cyclophosphamide-mediated protection against GVHD in mice. *Blood*. 2014 Sep 25;124(13):2131–41.
119. Kovacs G, Robrecht S, Fink AM, Bahlo J, Cramer P, von Tresckow J, et al. Minimal Residual Disease Assessment Improves Prediction of Outcome in Patients With Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) Who Achieve Partial Response: Comprehensive Analysis of Two Phase III Studies of the German CLL Study Group. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2016 Nov 1;34(31):3758–65.
120. Moors I, Vandepoele K, Philippé J, Deeren D, Selleslag D, Breems D, et al. Clinical implications of measurable residual disease in AML: Review of current evidence. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2019 Jan;133:142–8.
121. Bach C, Steffen M, Roesler W, Winkler J, Mackensen A, Stachel K-D, et al. Systematic comparison of donor chimerism in peripheral blood and bone marrow after hematopoietic stem cell transplantation. *Blood Cancer J*. 2017 02;7(6):e566.
122. Stumph J, Vnencak-Jones CL, Koyama T, Frangoul H. Comparison of peripheral blood and bone marrow samples for detection of post transplant mixed chimerism. *Bone Marrow Transplant*. 2008 Mar;41(6):589–90.
123. Rosenow F, Berkemeier A, Krug U, Müller-Tidow C, Gerst J, Silling G, et al. CD34+ lineage specific donor cell chimerism for the diagnosis and treatment of impending relapse of AML or myelodysplastic syndrome after allo-SCT. *Bone Marrow Transplant*. 2013 Aug;48(8):1070–6.
124. Unnikrishnan A, Meacham AM, Goldstein SS, Ta M, Leather HL, Cogle CR, et al. CD34+ chimerism analysis for minimal residual disease monitoring after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Leuk Res*. 2018 Nov;74:110–2.
125. Moscardó F, Sanz J, Senent L, Cantero S, de la Rubia J, Montesinos P, et al. Impact of hematopoietic chimerism at day +14 on engraftment after unrelated donor umbilical cord blood transplantation for hematologic malignancies. *Haematologica*. 2009 Jun;94(6):827–32.
126. Lawler M, McCann SR, Marsh JCW, Ljungman P, Hows J, Vandenberghe E, et al. Serial chimerism analyses indicate that mixed haemopoietic chimerism influences the probability of graft rejection and disease recurrence following allogeneic stem cell transplantation (SCT) for severe aplastic anaemia (SAA): indication for routine assessment of chimerism post SCT for SAA. *Br J Haematol*. 2009 Mar;144(6):933–45.
127. Horn B, Wahlstrom JT, Melton A, Liou A, Ouachee-Chardin M, Sunkersett G, et al. Early mixed chimerism-based preemptive immunotherapy in children undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for acute leukemia. *Pediatr Blood Cancer*. 2017 Aug;64(8).

128. Jacque N, Nguyen S, Golmard J-L, Uzunov M, Garnier A, Leblond V, et al. Chimerism analysis in peripheral blood using indel quantitative real-time PCR is a useful tool to predict post-transplant relapse in acute leukemia. *Bone Marrow Transplant.* 2015 Feb;50(2):259–65.
129. Sellmann L, Rabe K, Bünting I, Dammann E, Göhring G, Ganser A, et al. Diagnostic value of highly-sensitive chimerism analysis after allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2018 Nov;53(11):1457–65.
130. Vicente DC, Laranjeira ABA, Miranda ECM, Yunes JA, de Souza CA. Chimerism interpretation with a highly sensitive quantitative PCR method: 6 months median latency before chimerism drop below 0.1. *Bone Marrow Transplant.* 2016;51(6):874–5.
131. Navarro-Bailón, A, Martínez-Laperche, C, Carbonell, D, Buces, E, González-Rivera, M, Bastos, M, et al. A novel quantitative PCR approach targeting insertion / deletion polymorphisms (indel-PCR) for chimerism quantification: finally high sensitivity and quantification capacity together. In: Oral presentation. Istanbul: 41th EBMT Annual Meeting; 2015.

